

アカパンカビ(*Neurospora crassa*)における紫外線 損傷修復関連遺伝子の解析

著者	佐藤 正仁
学位授与大学	東洋大学
取得学位	博士
学位の分野	生命科学
報告番号	甲第198号
学位授与年月日	2008-03-25
URL	http://id.nii.ac.jp/1060/00003963/

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) における
紫外線損傷修復関連遺伝子の解析

生命科学研究科 生命科学専攻 博士後期課程

4910030002

佐藤 正仁

目次

アカパンカビ(*Neurospora crassa*)における 紫外線損傷修復関連遺伝子の解析

生命科学研究科 生命科学専攻 博士後期課程

4910030002

佐藤 正仁

目次

第1章 諸論.....	1
第2章 アカパンカビ <i>ncRAD10</i> 遺伝子の解析	6
2-1 緒言	6
2-2 材料と方法.....	7
2-3 結果と考察.....	14
2-3-1 アカパンカビ <i>ncRAD10</i> 遺伝子の検索	14
2-3-2 RIP 法による <i>ncRAD10</i> 遺伝子破壊株の作成	19
2-3-3 <i>mus-44</i> 変異株の変異原感受性	20
2-3-4 <i>mus-44</i> 遺伝子のエピスタシス解析.....	22
2-3-5 <i>mus-44</i> 変異株の復帰突然変異頻度の測定	24
第3章 アカパンカビ <i>ncRAD14</i> 遺伝子の解析	25
3-1 緒言	25
3-2 材料と方法.....	26
3-3 結果と考察.....	33
3-3-1 アカパンカビ <i>ncRAD14</i> 遺伝子の検索	33
3-3-2 RIP による <i>ncRAD14</i> 遺伝子破壊株の作製・解析	39
3-3-3 <i>mus-43</i> 変異株の変異原感受性	41
3-3-4 <i>mus-43</i> におけるエピスタシス解析.....	43
3-3-5 <i>mus-43</i> 変異株の復帰突然変異頻度の測定	43
第4章 アカパンカビ <i>ncRAD4A</i> , <i>ncRAD4B</i> , <i>ncRAD23</i> 遺伝子の解析	47
4-1 緒言	47
4-2 材料と方法.....	48
4-3 結果と考察.....	57

4-3-1 アカパンカビ <i>ncRAD4A</i> , <i>ncRAD4B</i> , <i>ncRAD23</i> 遺伝子の検索	57
4-3-2 相同組換え法による <i>ncRAD4A</i> , <i>ncRAD4B</i> , <i>ncRAD23</i> 遺伝子破壊株の単離	62
4-3-3 <i>ncRAD4A</i> , <i>ncRAD4B</i> , <i>ncRAD23</i> 破壊株の変異原感受性.....	63
4-3-4 <i>ncRAD4A</i> , <i>ncRAD4B</i> , <i>ncRAD23</i> におけるエピスタシス解析	63
第 5 章 アカパンカビ <i>ncRAD26</i> 遺伝子の解析	70
5-1 緒言	70
5-2 材料と方法.....	71
5-3 結果と考察.....	78
5-3-1 アカパンカビ <i>ncRAD26</i> 遺伝子の検索	78
5-3-2 相同組換え法による <i>ncRAD26</i> 遺伝子破壊株の単離.....	78
5-3-3 <i>ncRAD26</i> 破壊株の変異原感受性	80
5-3-4 <i>ncRAD26</i> におけるエピスタシス解析	81
第 6 章 NER 経路と第二除去修復経路、光回復との関係	83
6-1 緒言	83
6-2 材料と方法.....	84
6-3 結果と考察.....	89
6-3-1 <i>mus-43</i> , <i>mus-44</i> 変異株の光回復反応の誘導.....	89
6-3-2 <i>Micrococcus luteus</i> エンドヌクレアーゼによる CPDs 除去能の解析 ...	91
6-3-3 ELISA 法による損傷除去の測定	92
第 7 章 総合考察および結論	93
引用文献.....	99
謝辞	105

第1章 諸論

DNA は遺伝情報を保持しており、それを子孫に正確に伝えなければならない。しかしながら、DNA は、放射線、紫外線、環境変異原などの外的要因や、活性酸素などの生体内の代謝過程で生じる産物による内的要因により、絶えず損傷を受けている。DNA 損傷には様々なタイプが存在するが、代表的な紫外線 UV-C ではピリミジン二量体が形成され、主にシクロブタン型ピリミジン二量体 (cyclobutane pyrimidine dimers; CPDs) と (6-4) 光産物 (pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts; 6-4PPs) が誘発される (Fig.1-1)。また、変異原として知られる種々の化学薬剤は簡単な塩基のメチル化から、DNA とタンパク質間に結合し複合体を形成させるものまで様々な損傷が存在する。例えばシスプラチン (cisplatin) では、DNA 鎖内に存在する隣接するプリン (GG か AG) 間に付加し、それら塩基間でクロスリンクを生じさせる (Plooy et al., 1984)。代表的な薬剤である MMS (methylmethanesulfonate) は、*N*⁷-alkylguanine、*O*⁶-alkylguanine、*N*³-alkyladenine、*O*⁴-alkylthymidine などの塩基のメチル化や、リン酸ジエステルをメチル化し、さらには DNA の一本鎖切断も一部に生じさせる。4NQO (4-nitroquinoline 1-oxide) は化学発癌物質であり、嵩高い付加物を塩基に付加し DNA 二本鎖に歪みを生じさせる [Gallieque-Zouilina et al., 1985]。BLM (Bleomycin) は、抗腫瘍性の薬剤であり、DNA の一本鎖切断または、二本鎖切断を誘発させることが広く知られている [Urdea et al., 1988] (Fig. 1-1)。

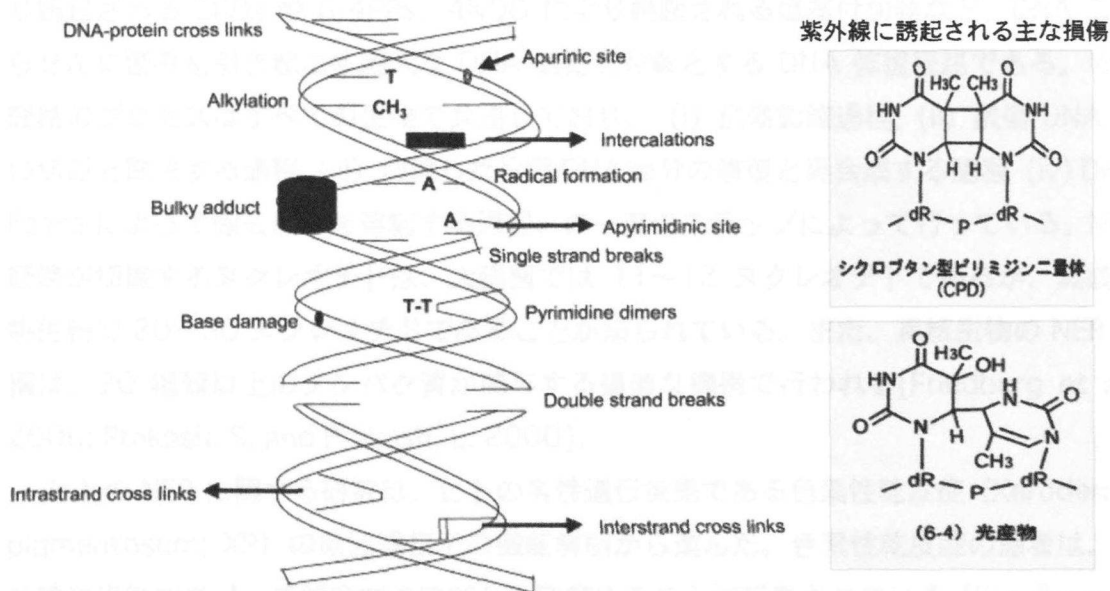


Fig. 1-1. さまざまな変異原により生じる損傷の種類

これらさまざまな損傷は、DNA 複製や転写などの細胞機能を維持するうえで重要な代謝活動を阻害し、最悪の場合は細胞死を引き起こす。また、これらの損傷が修復されずに DNA 複製が行われると、突然変異を生じ癌化の原因にもなる。しかし生物は細菌からヒトまでこのような DNA 損傷を修復する機構を進化の過程で複数獲得し、細胞の遺伝情報を正常に維持している。このようなメカニズムは DNA 修復機構と呼ばれ、除去修復、組換え修復、複製後修復の 3 つに大別されている。

これまでに、原核生物、真核生物を問わず様々な生物で DNA 修復機構の研究がなされており、原核生物では大腸菌 (*Escherichia coli*) を中心に除去修復、組換え修復などに欠陥のある突然変異体が数多く単離・解析され、それぞれの修復に関連する遺伝子が同定されている。真核生物では、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を中心に DNA 修復系遺伝子の突然変異体が数多く単離・解析され、そしてそれらの原因遺伝子が同定されている。出芽酵母の DNA 修復に関連する遺伝子も、様々な変異原に対する感受性の特徴や相互のエピスタシスの関係により、除去修復を行う RAD3 グループ、組換え修復を行う RAD52 グループ、複製後修復を行う RAD6 グループの 3 つに分類されてきた [Friedberg et al., 2006]。そのなかでも除去修復系は塩基除去修復 (BER; base excision repair) とヌクレオチド除去修復 (NER; nucleotide excision repair) の二つが基礎となっており、生体内で重要な役割を担っている [Hoeijmakers, 1990; Hoeijmakers, 1993; Wood, 1997]。

除去修復系に含まれる NER 経路は、大腸菌などの細菌からヒトまで、すべての生物に存在する重要な経路である [Friedberg et al., 2006]。NER 経路は、紫外線により誘起される CPDs や 6-4PPs、4NQO により誘起される塩基付加物など、DNA 二重らせんに歪みを引き起こす膨大な DNA 損傷を対象とする DNA 修復経路である。NER 経路のプロセスはすべての生物で共通しており、(i) 損傷認識過程, (ii) 損傷 DNA 鎖の切断と除去する過程, (iii) 切除した損傷 DNA 部分の修復と再合成する過程 (iv) DNA ligase によって除去部分を連結する過程、の一連のステップによって行っている。NER 経路が切除するヌクレオチドは、大腸菌では 11~12 ヌクレオチドであるが、真核生物で 20~30 ヌクレオチドであることが知られている。また、真核生物の NER 機構は、20 種類以上のタンパク質が関与する複雑な機構で行われる [Friedberg et al., 2006; Prakash, S. and Prakash, L. 2000]。

ヒトの NER に関する研究は、ヒトの劣性遺伝疾患である色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum; XP) の原因遺伝子の機能解明から進んだ。色素性乾皮症の患者は、紫外線に過敏であり、高頻度で皮膚がんを発症することが報告されている [Friedberg et al., 2006]。これまでに色素性乾皮症の患者から確立された細胞系を用いた研究から、

XP 遺伝子が 8 つの相補性グループ (XPA-XPG, XPV) に分類され、そのうち XPA-XPG の 7 つの遺伝子が、NER 経路に関連することが明らかになっている。

ヒト XP 遺伝子に相同な遺伝子は、酵母からマウスまで真核生物には広く存在している [Hoeijmakers and Hoeijmakers, 1993]。出芽酵母では *RAD3* グループに属する *RAD1*, *RAD2*, *RAD3*, *RAD4*, *RAD4*, *RAD25* 遺伝子が、XPA から XPG の遺伝子 (XPE を除く) にそれぞれ相当し、各遺伝子の変異体が紫外線に対し顕著な感受性を示している [Terleth and Verhage, 1994]。

これまでの研究により、ヒトや出芽酵母の NER モデルでは上流の DNA 損傷認識過程において、CSA と CSB が機能する転写と共役した修復経路 TCR (transcription-coupled repair) 経路と XPC と HR23B が中心的な役割をする非転写鎖およびゲノム全体を網羅的に修復の対象とする経路である GGR (global genomic repair) 経路の二つのサブ経路が存在することがわかっている。上流の TCR 経路と GGR 経路によって損傷認識された後、RPA (replication protein A) と XPA および転写因子でもある TF II H (XPD と XPG を含む) を介し、損傷塩基の 5'末端側構造特異的エンドヌクレアーゼである XPF/ERCC1 複合体と 3'末端側構造特異的エンドヌクレアーゼである XPG が損傷 DNA の両端をそれぞれ切除し、そのご修復 DNA 合成と DNA ligase による取り除かれたヌクレオチド部分が複製され一連の修復を完了させることが考えられるモデルが提唱されている (Fig. 1-2) [Wood, 1997]。

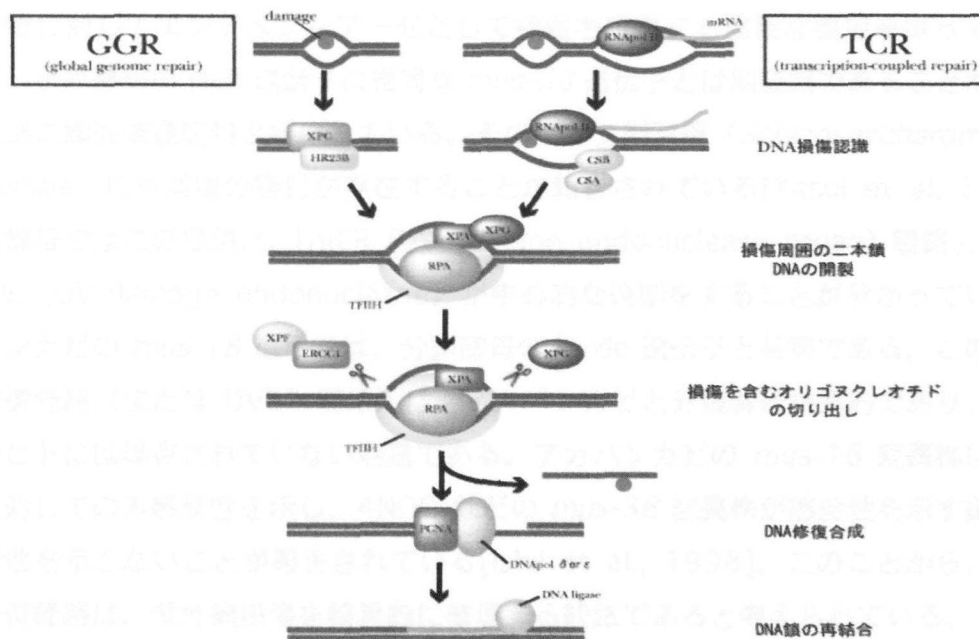


Fig. 1-2. ヒトにおける NER モデル

糸状菌であるアカパンカビ (*Neurospora crassa*) における DNA 修復の研究の歴史は古くからおこなわれてきているが、それらの研究の多くが細胞レベルでの研究であり、分子レベルでの研究はあまり進でいなかった。近年アカパンカビのゲノムデータが公開されるようになり、遺伝子レベルでの研究が可能となった。アカパンカビにおける NER 機構に関する研究はこれまでほとんどすすでらず、わずかに *mus-38* 遺伝子の報告 [Ishii et al., 1998; Hatakeyama et al., 1998] と、論文での報告はないが *mus-40* 遺伝子の報告 [Inoue et al. Unpublished data] があるだけであった。*mus-38* はヒト *XPF*、出芽酵母 *RAD1* に相同な遺伝子であり、*mus-38* 変異株は紫外線および 4NQO に対して感受性を示すことが報告されている[Ishii et al., 1998; Hatakeyama et al., 1998]。また、*mus-40* 遺伝子はヒト *XPG*、出芽酵母 *RAD2* 遺伝子のホモログであり、*mus-40* 遺伝子変異株もまた *mus-38* 変異株同様に紫外線と 4NQO に感受性を示す。しかしながら、*mus-38* と *mus-40* の 2 種類の遺伝子の変異株は、出芽酵母やヒトで報告されている NER 変異株の示す紫外線感受性に比べその紫外線感受性は野生株に比べてもそれほど高くない。また、アカパンカビ自体の紫外線感受性は、出芽酵母やヒトに比べると約 20 倍耐性である。

アカパンカビが紫外線に高度に耐性を示す原因として、アカパンカビが持つ第二除去修復経路の存在があげられている。この第二除去修復経路は、アカパンカビにおいてまず報告され、*mus-18* 遺伝子が中心的な機能を持つことが分かっている[Yajima et al., 1995]。第二除去修復経路は、*mus-18* 遺伝子のコードするタンパク質が紫外線損傷に対してエンドヌクレアーゼとして損傷を修復する重要な機能を持っており、ヒト、出芽酵母の NER 遺伝子に相同な *mus-38* 遺伝子とは別経路であることが確認され、第二除去修復経路と呼ばれている。その後、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) にも同様の経路が存在することが報告されている[Yasui et al. 2000]。分裂酵母ではこの経路は、UVER (UV-damage endonuclease repair) 経路と呼ばれ、UVDE (UV-damage endonuclease) が中心的な役割をすることが分かっている。アカパンカビの *mus-18* 遺伝子は、分裂酵母の *Uvde* 遺伝子と相同である。この第二除去修復経路 (または UVER 経路) は、アカパンカビと分裂酵母特異的であり、出芽酵母やヒトには保存されていない経路である。アカパンカビの *mus-18* 変異株は、紫外線に対してのみ感受性を示し、4NQO などの *mus-38* 変異株が感受性を示す薬剤には感受性を示さないことが報告されている[Ishii et al., 1998]。このことから、第二除去修復経路は、紫外線損傷を特異的に修復する経路であると考えられている。

アカパンカビには、紫外線損傷を修復する経路としてさらに光回復酵素による修復経路が存在することが報告されている[Shimura et al., 1999]。光回復経路は、光回

復酵素のみで行われ、光回復酵素が可視光のエネルギーを吸収することで、ピリミジン二量体を開裂する。光回復酵素は、細菌や植物、魚類など広く存在するが、ヒトや分裂酵母にはこの光回復酵素が存在しないことが報告されている[Friedberg et al.,

2006]。この光回復酵素には、その基質特異性により 2 種類の光回復酵素が存在し、CPDs 特異的な光回復酵素と 6-4PPs 特異的な光回復酵素が存在する。アカパンカビはこのうち、CPDs 特異的な光回復酵素のみを保持しており、この CPDs 特異的な光回復酵素は *phr* 遺伝子によりコードされている[Shimura et al., 1999 Friedberg et al. 2006]。

本研究では、アカパンカビの紫外線損傷修復経路に関与する遺伝子について研究を行った。まず、アカパンカビではその経路の詳細が分かっていない NER 経路について、アカパンカビゲノムプロジェクトのデータを利用することで、出芽酵母の NER 関連遺伝子との相同な遺伝子を検索し、その破壊株を作成し、紫外線感受性等の表現型解析を行った。第 2 章において、NER 経路下流の損傷切り出しの過程で働くことが予想される *mus-44* 遺伝子について解析を行った。第 3 章は、同じく NER 経路下流で機能し、損傷塩基に結合することが予想されている *mus-43* 遺伝子についての解析を行った。第 4 章では、NER 経路上流の認識過程で重要な *ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 遺伝子の解析を行った。第 5 章では、NER 上流の TCR 特異的な認識経路で機能することが予想される *ncRAD26* 遺伝子について解析を行った。第 6 章では、NER 経路と光回復経路との間の関係および、NER 経路と UVER 経路との関係を解析した。これにより、アカパンカビがもつ複数の紫外線損傷修復経路とアカパンカビが示す高度紫外線耐性との間の関係を明らかにした。

第2章 アカパンカビ *ncRAD10* 遺伝子の解析

2-1 緒言

アカパンカビではこれまで、NER 関連遺伝子としては、*mus-38* 遺伝子と *mus-40* 遺伝子の2種類の遺伝子しか解析が進んでおらず、その他の NER 関連遺伝子については全くわかっていなかった。近年アカパンカビゲノムプロジェクトの終了を受けて、ゲノムデータの公開が行われており、それを利用することで他の生物の遺伝子とのホモロジー検索が可能となった。また、アカパンカビにみられる現象である RIP(Repeat-induced point mutation)を利用することで、遺伝子を不活性化することも可能である。

出芽酵母の NER 関連遺伝子である *RAD10* がコードする Rad10 タンパク質は、Rad1 タンパク質と複合体を形成することで、損傷 DNA 5'末端側構造特異的エンドヌクレアーゼとして機能することが知られており、NER 機能において重要な遺伝子である[Friedberg et al., 2006]。ヒトでは、*RAD10* 遺伝子に対応する遺伝子として ERCC1 が存在し、*RAD1* 遺伝子に対応する遺伝子として XPF が存在する。また、Rad-Rad10 エンドヌクレアーゼと XPF-ERCC1 エンドヌクレアーゼは NER 経路で機能するとともに、組換え経路においても機能することが報告されている[Friedberg et al., 2006]。

これまでアカパンカビでは、出芽酵母 *RAD1* ホモログとして *mus-38* 遺伝子が同定・解析がされており、紫外線や 4NQO などに対し感受性を示すことがわかっている。しかし、Rad1 タンパク質と複合体を形成する *RAD10* については、アカパンカビにおいてその存在は分かっていなかった。今回、アカパンカビゲノムデータベースを利用することで、アカパンカビ *RAD10* ホモログ遺伝子を検索するとともに、その遺伝子の変異株をアカパンカビにみられる RIP 現象を利用して作成し、その変異株の表現型解析を行うことで、アカパンカビ *RAD10* ホモログ遺伝子の機能解析を行った。

2-2 材料と方法

〔使用菌株とベクター〕

本実験で使用したアカパンカビの株とその遺伝子型を Table 2-1 に示した。アカパンカビ野生株として、C1-T10-37A と C1-T10-28a をそれぞれ使用した[Tamaru and Inoue, 1989]。 *mus-38* 変異株 (CZ-272-16A, CZ-272-5a)、 *mus-18* 変異株 (C2-T40-9A)、 *mei-3* 変異株 (FGSC2764A)、 *uvs-2* 変異株 (74-OR244-3A)、 *pan-2* 変異株 (FGSC4105A, C2-S2-8A) は、埼玉大学遺伝学研究室より頂いた。プラスミド構築に使用した大腸菌の株とその遺伝子型を Table 2-2 に示した。PCR 増幅 DNA 断片のクローニングには pT7-Blue® (Novagen)を使用し、アカパンカビの形質転換には pCB1003 をベクターとして用いた。pCB1003 プラスミドには、アカパンカビ細胞内で機能する選択マーカーとしてハイグロマイシン B 耐性遺伝子(*hygB*)が挿入されている。pYK10 は PCR によって増幅した *ncRAD10* 遺伝子断片を TA-クローニングによって pT7Blue®に挿入し作製した。pYK10-T は、作成した pYK10 から約 1.4kbp の *Kpn*I / *Xba*I 断片を pCB1003 の *Kpn*I / *Xba*I サイトに挿入し作製した。アカパンカビゲノムライブラリー (pMOcosX) [Orbach and Sachs, 1991]は、

Table 2-1. Strains of *N.crassa* used in this study

Strain number	Genotype	Source/reference
C1-T10-37A	A	Tamaru and Inoue (1986)
C1-T10-28a	a	Tamaru and Inoue (1986)
FGSC4105A	A <i>pan-2</i> (B36)	FGSC
C2-S2-8a	a <i>pan-2</i> (OGW1)	Kawabata et al.(2008)
CZ-272-16A	A <i>mus-38</i>	Ishii et al.(1998)
CZ-272-5a	a <i>mus-38</i>	Ishii et al.(1998)
C2-T40-9A	A <i>al-2 pan-2 cot-1 mus-18</i>	Ishii et al.(1991)
74-OR244-3A	A <i>al-2 pan-2 cot-1 uvs-2</i>	De Serres et al. (1980)
FGSC2764A	A <i>mei-3</i>	FGSC
TNK-CT-1A	A <i>mus-44</i> ^{RIP}	This study
TNK-CT-1a	a <i>mus-44</i> ^{RIP}	This study
TNK-B36-21A	A <i>mus-44</i> ^{RIP} <i>pan-2</i> (B36)	This study
TNK-OGW-36a	a <i>mus-44</i> ^{RIP} <i>pan-2</i> (OGW1)	This study
TNK-me3-2a	A <i>mei-3 mus-44</i> ^{RIP}	This study
TNK-m18-4A	A <i>mus-18 mus-44</i> ^{RIP} <i>pan-2</i>	This study
TNK-m38-1A	A <i>mus-38 mus-44</i> ^{RIP}	This study
TNK-u2-7a	A <i>uvs-2 mus-44</i> ^{RIP}	This study

FGSC, Fungal Genetic Stock Center

FGSC(Fungal Genetics Stock Center)より入手した。

Table 2-2. Strains of *E. coli* used in this study

Strain number	Genotype
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), e14- (mcrA-), supE44, relA1, Δ (lac-proAB)/F' [traD36, proAB+, lacIq, lacZ Δ M15]</i>
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F-, φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1</i>

[培養]

アカパンカビの培養には、VM 培地（1×Vogel 最少培地，1.2 %（w/v） ショ糖）を使用し、寒天培地には 1.2 %（w/v） 寒天を加えた[Vogel, 1964]。ハイグロマイシン B 耐性の形質転換体の選抜には、最終濃度 500 μg/ml のハイグロマイシン B を培地に加えて行った。アカパンカビの分生子形成は、グリセロール完全培地（1×Vogel 最少培地，1 %（v/v） グリセロール，0.25 %（w/v） yeast extract，0.1 %（w/v） カザミノ酸，0.5 %（w/v） malt extract，1 %（v/v） ビタミンストック溶液，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて、1 週間培養することで行った。アカパンカビの交配は、SC 培地（1×Westergaards'合成培地，1.2%（w/v） ショ糖，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて行った。アカパンカビのコロニー形成には、コロニー形成培地（1×Vogel 最少培地，0.2 %（w/v） ショ糖，1 %（w/v） ソルボース，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて行った。基本培地の成分は、Table 2-3 にまとめた。

大腸菌の培養には、LB 培地（1 %（w/v） バクトトリプトン，0.5 %（w/v） 酵母エキス，1 %（w/v） 塩化ナトリウム）を使用し、寒天培地には 1.2 %（w/v） 寒天を加えた。アンピシリン耐性の選抜には、アンピシリンを最終濃度 50 μg/ml になるように加えて行った。

Table 2-3. Mediums used in this study

50×Vogel's 最少培地(1000ml 中)		
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O		125g
KH ₂ PO ₄		250g
KH ₄ NO ₃		100g
MgSO ₄ · 7H ₂ O		10g
CaCl ₂ · 2H ₂ O		5g
ビオチン水溶液		25ml
Vogel's 微量元素液		5ml
Vogel's 微量元素液(100ml 中)		
C ₆ H ₈ O ₇ · 2H ₂ O		5g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		5g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O		1g
CuSO ₄ · 5H ₂ O		0.25g
MgSO ₄ · H ₂ O		0.05g
H ₃ BO ₃		0.05g
NaMoO ₄ · 2H ₂ O		0.05g
ビオチン水溶液 (1000ml 中)		
Biotin		40mg
ビタミンストック溶液 (100ml 中)		
サイアミン (ビタミン B1)		10mg
リボフラビン (ビタミン B2)		5mg
ピリドキシン (ビタミン B6)		5mg
パントテン酸カルシウム		50mg
パラアミノ安息香酸		5mg
ニコチン酸アミド		5mg
塩酸コリン		100mg
葉酸		1mg
イノシトール		100mg
10×Westergaards' 合成培地(1000ml 中)		
KNO ₃		10g
KH ₂ PO ₄		10g
MnSO ₄ · 7H ₂ O		5g
NaCl		1g
CaCl ₂		1.3g
Vogel's 微量元素液		10ml
ビオチン水溶液		10ml

[DNA 操作]

(i) 基本的な遺伝子工学的手法

プラスミド DNA の少量調整などの基本的な遺伝子工学的手法は、Sambrook らによる方法 [Sambrook et al., 1989]に従った。大腸菌の形質転換は、Perbal の実験書 [Perbal, 1988]に従った。コンピテント細胞作製には、JM109 株、DH5 α 株を使用した。精製した DNA の確認はアガロース電気泳動により行なった。

(ii) サザンハイブリダイゼーション

アガロースゲルからメンブレンへ DNA を移行するために、キャピラリートランスファーまたは VacuGene™ blotting system (Pharmacia)を使用した。メンブレンは、Hybond-N⁺(Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。DIG によるプローブの標識法として、ランダムプライム法を用いた。ランダムプライム法には、DIG ハイプライム(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を使用した。メンブレンとプレハイブリダイゼーション溶液を耐熱性のタッパーに入れ、68℃で 2~3 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、熱変性させた標識プローブをタッパーに加え、15 時間以上 68℃で保温した。

ハイブリダイゼーション後の検出は、基質として NBT(ニトロブルーテトラゾリウムクロライド)と BCIP (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-リン酸)を用いた発色反応により行なった。まず、メンブレンを室温で No.1 洗浄液(2×SSC、0.1% SDS)で 5 分間、2 回洗浄し、次に 68℃で No.2 洗浄液(0.1×SSC、0.1% SDS)で 15 分間、2 回洗浄した後、Wash Buffer[0.3% Tween-20® in Buffer1(0.1M マレイン酸、0.15M NaCl ; pH7.5)]で 1 分間洗浄した。その後、Blocking Buffer (1% Blocking stock solution in Buffer1)で 30 分間インキュベーションした後、20ml の希釈抗体溶液(150mU AP 標識抗ジゴキシゲニン抗体、Fab フラグメント/ml Buffer)で 30 分間インキュベーションした。次に、Wash Buffer で 15 分間、2 回洗浄した後、メンブレンを検出 Buffer(100mM Tris-HCl、100mM NaCl、50mM MgCl₂ ;pH9.5)で 2 分間平衡化した。そして、暗冷下で、10ml の発色溶液(200 μ l NBT/BCIP 溶液/10ml 検出 Buffer)と共にメンブレンをインキュベーションし、発色反応させて検出した。

(iii) PCR

PCR 法による *ncRAD10* 遺伝子断片の増幅には、Taq polymerase を用いた。0.2ml のマイクロチューブに、鋳型 DNA (0.05 μ g)、プライマー (0.5 μ M)、5 μ l の 10×緩衝液、5 μ l の 25mM 塩化マグネシウム溶液、1 μ l の Taq polymerase を加

えて、水(D.W.)で 50 μ l になるようにした。PCR 反応は、94℃ 1 分間 (変性)、57℃ 1 分間 (アニーリング)、72℃ 1 分間 (DNA の伸長) を 1 サイクルとして 30 回繰り返した。すべてのプライマーの合成と精製は、日本バイオサービス社に依頼した。

(iv) DNA 塩基配列の決定

DNA 断片は、ALFexpress™ AutoCycle™ Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて伸長反応を行ない、塩基配列自動決定装置 ALFexpress シークエンサー (Amersham Pharmacia Biotech) によって、塩基配列を決定した。決定された DNA 断片の塩基配列は GENETYX-WIN/ATSQ (ソフトウェア開発) により解析を行った。

[遺伝子の不活化]

RIP (Repeat-induced point mutations) [Selker, 1990] を利用して、目的とする遺伝子の不活化を行った。まず、不活化させる遺伝子の一部分の DNA 断片 (*ncRAD10* の約 1.5 kbp) を PCR 法により増幅し、pT7Blue ベクターに組み込み、pYK10 プラスミドを作成した。pYK10 プラスミドより制限酵素 *Kpn*I と *Xba*I により切り出される約 1.4 kb の断片を、アカパンカビのベクターである pCB1003 の *Kpn*I/*Xba*I サイトに組み込み、pKY10-T プラスミドを作成した。作成した pKY10-T プラスミドによってアカパンカビ野生株 (C1-T10-37A) を形質転換し、ハイグロマイシン B を含む培地上で 28℃、2 日間培養した。ハイグロマイシン B 抵抗性を示した形質転換体を単離し、これを交配型の異なる野生株 (C1-T10-28a) と交雑することによって RIP を誘発した。

RIP による点突然変異生成の確認は、交雑によって生じた子嚢胞子を単離し、培養後菌糸からゲノム DNA を抽出し、この DNA に含まれる *ncRAD10* 遺伝子の制限酵素認識部位が野生株と比較して変化しているかどうかを PCR-RFLP 法および、*ncRAD10* 遺伝子の塩基配列を決定することで確認した。PCR-RFLP 法は、回収したゲノム DNA と野生株のゲノム DNA それぞれを鋳型とし、*ncRAD10* 遺伝子特異的なプライマーを用いて RIP を行った。増幅した遺伝子断片を任意の制限酵素で処理した後、電気泳動を行った。これにより検出される DNA 断片パターンが野生株と異なる制限酵素を確認した。また、RIP による点突然変異生成を確認するため、PCR によって増幅させた遺伝子断片の塩基配列を決定し、点突然変異を生じた子孫株を *ncRAD10* 遺伝子破壊株として以後の実験に用いた。

[アカパンカビの形質転換]

アカパンカビの形質転換は、Vollmer と Yanofsky の方法 [Vollmer and Yanofsky 1986] 及び Tomita らの方法 [Tomita et al., 1993] を基本として、以下のよう
に改変して行なった。

グリセロール完全培地上で 7 日間培養した菌体より回収した分生子を 2～3 時間培
養し、発芽を確認した後、1M Sorbitol 溶液で洗浄・遠心した。ペレット状にした分
生子を、1M sorbitol で 2mg/ml に調製した LYSING ENZYMES from *Trichoderma*
harzianum(SIGMA)を 2ml 加え、懸濁し、30℃で低速振とうをした。酵素反応開始か
ら約 60 分経った後、分生子の一部をサンプリングし、顕微鏡下でサンプルに水を加
えることにより細胞破壊が起きることを調べ、スフェロプラスト化の確認を行なった。
その後スフェロプラストを 1M sorbitol 溶液で 2 回洗浄し、CaCl₂ sol. [50mM CaCl₂、
1M sorbitol、50mM Tris-HCl(pH8.0)]で洗浄したのち、CaCl₂ sol. 1.2ml、PEG
sol.[40% PEG4000、50mM CaCl₂、50mM Tris-HCl(pH8.0)] 400 μ l 加え、スフェ
ロプラスト溶液とした。スフェロプラスト溶液 30～50 μ l と 5 μ l ヘパリン溶液
(heparin 5mg/ml in CaCl₂ sol.)、2 μ l スペルミジン溶液(50mM spermidine-3HCl)、
3～5 μ l DNA 溶液を混合し、氷上で 30 分間静置した後、PEG sol. 300 μ l 加え、20
分間室温で静置した。その後、溶解して 50℃で保温しておいた上層培地と混合し、ハ
イグロマイシン B(0.5mg/ml)を含む下層培地上に拡げ、30℃で 2 日間培養した。

単離した形質転換体をホモカリオンにするため、分生子を 1ml の滅菌水に懸濁した
のち、ハイグロマイシン B を含むコロニー形成用培地に加え、シャーレ (φ90mm)
に拡げた。30℃で 2 日間培養した後、ハイグロマイシン B 耐性を指標にして、形質転
換された核のみを持つ株を選別し以後の解析に用いた。

[アカパンカビの遺伝学的解析]

アカパンカビの交雑など遺伝学的解析は Davis と de Serres の方法 [Davis and de
Serres, 1970] に従って行なった。

[アカパンカビからのゲノム DNA の調整]

アカパンカビからのゲノム DNA の調整は、Irelan らの方法 [Irelan et al. 1993]に
従った。30ml の液体培地に少量の菌糸を植え、30℃で 2 日間振とうした後、培養液
を濾過して菌糸を集めた。この菌糸を液体窒素で瞬間冷凍して、ゲノム DNA の調整に
用いた。DNA は 260nm で吸光度を測定して定量した。定量後、サザンハイブリダイ
ゼーションやゲノム DNA を鋳型とする PCR に用いた。

[スポットテスト]

アカパンカビの各種変異原に対する感受性を調べるために、スポットテストを行なった。培地としてコロニー形成を用いた。

変異原 4NQO、MMS はオートクレーブ滅菌後の培地が 60℃以下になった時に加え、一様にシャーレにひろげた。試験する株の分生子を滅菌水に懸濁し、この懸濁液をプレート状にひろげた寒天培地上にパスツールピペットを用いてスポットした。28℃で 2 日間培養後、菌糸の増殖を調べた。紫外線に対する感受性は、変異原を添加していないプレート上に分生子の懸濁液をスポットした後、75~225J/m²の紫外線を照射し、遮光した暗条件下で 28℃、2 日間培養し、菌糸の増殖を調べた。

[アカパンカビの紫外線感受性試験]

変異原処理したアカパンカビの生存率の測定は、Inoue と Ishii の方法 [Inoue and Ishii, 1984] に従った。

アカパンカビ分生子を 1/15M リン酸緩衝液[pH7.0]に懸濁し、 1×10^6 個/ml の懸濁液とした。これを 9cm シャーレに 20ml ずつ加え、そこに紫外線を照射した。紫外線は 2.5J/m².sec の強度で照射した。照射後、100 μ l 採取し希釈した後、1000 個をコロニー形成用寒天培地に混ぜて 15cm シャーレにひろげ、30℃で 3 日間培養して生じたコロニーを数え、これをもとに生存率を求めた。

[復帰突然変異頻度の測定]

突然変異頻度は *pan-2* 遺伝子座の復帰突然変異頻度を指標として測定した。突然変異頻度のテスター株として使用した *pan-2* 変異株の対立遺伝子 B36 および OGW-1 は、それぞれ *pan-2* 遺伝子座の異なる部位に塩基置換型とフレームシフト型の突然変異をもつ株である [Ogawa, Unpublished data]。これらの株と *ncRAD10* 遺伝子破壊株を交雑し、*ncRAD10 pan-2* 二重変異株を作製した。紫外線照射後の 1×10^7 の分生子をコロニー形成のための培地と混合してシャーレにまいた。紫外線誘発突然変異頻度は、パントテン酸を含むコントロール形成培地でのコロニー数に対するパントテン酸を含まない培地でのコロニー数によって算出した。

2-3 結果と考察

2-3-1 アカパンカビ *ncRAD10* 遺伝子の検索

出芽酵母 *RAD10* 遺伝子のホモログをアカパンカビのゲノムプロジェクトデータベース Whitehead Institute for Biomedical Research (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>)を利用して検索を行った。検索を行った結果、出芽酵母 Rad10 タンパク質のアミノ酸配列に 35%の相同性を持つタンパク質をコードする遺伝子 NCU7066.3 が存在した。アカパンカビゲノムプロジェクトデータベース中に、出芽酵母 *RAD10* のアミノ酸配列と E value において-1 乗以下を示す遺伝子は NCU07066.3 以外には存在せず、この遺伝子を *ncRAD10* と命名した。この遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列を Fig. 2-1A に示した。また、この *ncRAD10* 遺伝子のコードするアミノ酸配列を DDBJ で BLAST 検索を行った結果、最も相同性が高かったのは、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の *RAD10* 遺伝子ホモログである SWI10 [Rodel et al., 1992] であり、その E value は $2e^{-53}$ であった。またヒト ERCC1 (ヒトの *RAD10* ホモログ) では E value が $5e^{-42}$ 、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) Rad10 で E value が $3e^{-15}$ を示した。最も高い相同性を示した分裂酵母の Swi10 タンパク質とアカパンカビ *NCRAD10* タンパク質のアミノ酸配列の相同性は 48%で、続いてヒト ERCC1 との相同性が 43%であった。また、出芽酵母の Rad10 との相同性は 35%であった。

ゲノムデータベースのデータから、*ncRAD10* 遺伝子は、第VI連鎖群左腕のテロメア付近に位置することが明らかとなった。この領域には、DNA修復に関与する遺伝子の報告はなく、*ncRAD10* 遺伝子は新規のDNA修復遺伝子であると考えられる。また、*ncRAD10* は、イントロンを含まず、全長1218bpの遺伝子であり、塩基配列から予想される*NCRAD10*タンパク質は406アミノ酸残基であり、アミノ酸配列から予想される分子量は43.7kDaであった。

分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)の swi10 タンパク質のアミノ酸配列と *NCRAD10* のアミノ酸配列を比較した結果を Fig. 2-1B に示した。その結果、分裂酵母 Swi10 とアカパンカビ *NCRAD10* の間で高度に保存されている領域が存在していた。*NCRAD10* タンパク質の N 末端側から 83~290 番目のアミノ酸配列の領域にあり、ERCC1 ファミリータンパク質が機能する上で重要な領域が存在すると考えられた。実際、ERCC1 ファミリータンパク質におけるこの領域は、XPF タンパク質ファミリーと相互作用する領域と非特異的に DNA に結合するのに重要な領域 (UvrC-like domain) が存在するという報告がなされている[Tripsianes et al., 2005]。アカパン

XPF ホモログである MUS-38 タンパク質と相互作用すると考えられる領域は、NCRAD10 の 84~204 に保存されていた。また、223~281 には UvrC-like ドメインが保存されており、また、DNA 結合に重要な helix-hairpin-helix モチーフが 2 つ保存されていた。これらのことは、アカパンカビ NCRAD10 が ERCC1 ホモログタンパク質として機能していること強く示唆している。

CTGGCGTACTGTAAATAAGCAAACATAAACTGTATAGCACACTGTCCCCGCATCGCACT -180
 (i) CATCAGGCAATTCCAGACTT→CCCCGGATCTTGGCACATTCAATGTCTATTTTCATCATCCT -120
 CGATTTGAATTCGCGATACCTTCGTCGCGTGAATTCCTACTCTAGGTAGTCAGAACAAA -60

ATGGACGACGACTTTGACGATGCCGAGCTCCTCCAAGCTCTCGCCGCCTCCGAAGCAGCA 60
 M D D D F D D A E L L Q A L A A S E A A

GCAGCAGCCAGACAACAACAACCCCCAACGCCACCAGCACCACCACCACCAGGT 120
 A A A R Q Q Q Q P Q R P P A P P P P P G

CGCGGCATCGTCCAACCCACTCCCCAACGCCTTGACAAACCACCACTCTCCAACCTCCTCC 180
 R G I V Q P T P Q R L D K P P L S N S S

TCCTCTTCCACTGGCCCGGAATAGTCCAACCCACCCACAAAGCCCTCCCCGGCGCCCCGC 240
 S S S T G P R I V Q P T P Q A L P G A R

TCCTCCTCGGGCTCCTCCATCCTCGTCTCCCCGCGCCAAAAAGGCAACCCCGTGCTCGCC 300
 S S S G S S I L V S P R Q K G N P V L A

TCCATCAAGTCCACCGCGTGGAATACTCCGACATCCCCGCCGACTACGTCTCGGCACC 360
 S I K S T A W E Y S D I P A D Y V L G T

ACCACCTGCGCCCTTTTCCTGTCTCTCAAGTACCACCGTCTGCACCCAGAATACATCTAC 420
 T T C A L F L S L K Y H R L H P E Y I Y

ACGCGCATCCGCCTGTGTCAGCAAAACCGGTACAACCTGCGCATCCTGCTCACGCTCGTC 480
 T R I R L L Q Q N R Y N L R I L L T L V

GACATCCCCAACACGAGGAGCCCCCTGCGCGAGCTGTCCAAGACGTCGCTTGTCAACAAC 540
 D I P N H E E P L R E L S K T S L V N N

GTGACGGTCATCTTGTGCTGGTCGGCGCAGGAGGCGGCGGCTACTTGGAGCTGTACAAG 600
 V T V I L C W S A Q E A A R Y L E L Y K

(To be continued)

Fig. 2-1A アカパンカビ *ncRAD10* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配

TCGTACGAGCACGCGAGCGCGAGCGGATCCGAGGCCAGCAGAAGACGACGTACGCGGAG 660
 S Y E H A S A S A I R G Q Q K T T Y A E
 (ii)

CAAATGGTGGAGTTTGTGACGGTGCCGAGGAGCGTGAACAAGACGGATGCGATTGCGCTG 720
 Q M V E F V T V P R S V N K T D A I A L
 (iii)

GTGAGCACGTTTGGGAGCTTGCGGAATGCGATCAATGTGGCGACGGAGGCGAATGGGGAG 780
 V S T F G S L R N A I N V A T E A N G E

GAGCGGTTGGGGAACGTGCAGGGGTGGGGAGAGAAGAAGGTGAAGAGTTGGAGGAGAGCG 840
 E R L G N V Q G W G E K K V K S W R R A

GTGGAGGGGAGTTTTAGGGTGAGGAAGACGGCGGCGCAGGGACGGAACAAGGCTGCGACG 900
 V E G S F R V R K T A A Q G R N K A A T

GGTTCGGTTCGGGGTCAGGAGGGACGCAGTCACGGACGATGCAGACACAGACACAGACA 960
 G S G S G S G G T Q S R T M Q T Q T Q T

CAGACACGGACACGGCAGAAGGAACTGGATCATTACAGGACAGGAGGGCTGGCGATACC 1020
 Q T R T R Q K E T G S L Q D R R A G D T

GGGCACGGGCACGGTCCGAGGGAGGATGAGTACGATGAGATGGAGGCTGTTATGGCTGCT 1080
 G H G H G P R E D E Y D E M E A V M A A

GCTGCTGAGGAGGCGGGGTCGACGGTGGCTGCGGGCTCGAGTTCTACCAAAAACGACACT 1140
 A A E E A G S T V A A G S S S T K N D T

CAAGCTTCTCGGAGACAAGAGGAGGAACTGGGCGGTGGGGTTGCTGCTGCGTTGGCCAAA 1200
 Q A S R R Q E E E L G G G V A A A L A K

TTGAGGCAAGGAGGTTGAGGAAATATCAAGACATTCGGACACGTTGTCTGGTGGACTAAA 1260
 L R Q G G *

ACACGCCGTCTGTCCTACGACGAACACGTGGAGATATCGAAGAAAGTCTCGATTCAACGT 1320
 GTCTCGCCTCATGTCTTGACAGACACAAACACCACAGCTTACCCCTCACAAGAAAACGTG 1380
 (iv)

Fig. 2-1A アカパンカビ *ncRAD10* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

右側の数字は開始コドン(met)を基準として塩基数を、塩基配列の下段にはアミノ酸配列を記した。赤字で記したプライマー (i), (iv) は pT7-Blue®への挿入時に用いた。また、変異の確認には (i) - (iii)、(ii) - (iv) のプライマーを用いて塩基配列を決定した。

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

NCRAD10      MDDDFDDAELLQALAASEAAAAARQQQPQRPPAPPPPPGRGIVQPTPQRLDKPPLS---
spSwi10      -MSDIDDEE-FEQLAVSALEEVEKKAGFAQ-----QPTPQKVSR-----
scRad10      --MNNTDPTSFESILAGVAKLRKEKSGADTTGSQSLEIDASKLQQQEPQTSRRINSNQVI
               :  *   : :  : ..   .:               *  **   :

NCRAD10      -----NSSSSSTGPRIVQPTPQALPGARSSSGSSILVSPRQKGNPVLASIKSTAWEYS--
spSwi10      -----VTAHSILVNPRQKGNPLPHVRNPWEYT--
scRad10      NAFNQKQPEEWTDSKATDDYNRKRPFRSTRPGKTVLVNTTQKENPLLNHLKSTNWRVYSS
               .. : **.. ** **:*   :... *.

NCRAD10      ---DIPADYVLGTTTCALFLSLKYHRLHPEYIYTRIRLLQQNRYNLRILLTLVDIPNHEE
spSwi10      ---DIVPDFVMGTGICSLFLSLKYHHLHPEYIYSRISKLGKS-YNLRILLILVDVENHQA
scRad10      TGINMIYYDYLVGRSVLFLTLTYHKLYVDYISRRMQPLSRN--ENNILIFIVDDNNSD
               : :   :   . ***:* **:* : ** * : * :. : .** : ** * :

NCRAD10      PLRELSKTSLVNNVTIILCWSAQEAARYLELYKSYEHASASAIRGQQKTTYAEQMVEFVT
spSwi10      SIQELVKTSIVNQYTLILAWSSEEAAARYLETYKAYENMSPALIMEKPSTDYLSQVQSFLT
scRad10      TLNDITKLCMFNGFTLLAFNFEQAAKYIEYLNL-----
               : : : *  :.*  * :*: :.. : **:* :

NCRAD10      VPRSVNKTDALVSTFGSLRNAINVATEANGEERLGNVQGWGEKKVKSRRRAVEGSFRV
spSwi10      SIRGINKSDSLSLSKFGLERALVASRDE-----LEQLEGWPTKVNRFLAVQQPFMS
scRad10      -----

NCRAD10      RKTAAGRNKAATGSGSGGGTQSRTMQTQTQTQTRTRQKETGSLQDRRAGDTGHGHGPR
spSwi10      HSTIK--RPEAIN-----LKQT-----
scRad10      -----

NCRAD10      EDEYDEMEAVMAAAAEAGSTVAAGSSSTKNDTQASRRQEEELGGGVAAALAKLRQGG  405aa
spSwi10      ----- 252aa
scRad10      ----- 210aa

```

Fig. 2-1B NCRAD10 のアミノ酸配列の比較

アカパンカビ NCRAD10 と出芽酵母 scRad10、分裂酵母 spSwi10 のアミノ酸配列を比較した。NCRAD10 は出芽酵母と 35%、分裂酵母と 48%の相同性があった。赤線は UvrC-like ドメイン、helix-hairpin-helix モチーフを含む領域を記した。

2-3-2 RIP 法による *ncRAD10* 遺伝子破壊株の作成

アカパンカビゲノムデータベースから入手したゲノム DNA 塩基配列を基に *ncRAD10* 遺伝子上流と下流にプライマー *ncRAD10-F* (5-CGA GAC ACG TTG AAT CGA GAC T-3) とプライマー *ncRAD10-R* (5-CAT CAG GCA ATT CCA GAC TTC C-3) の 2 つを設計した (Fig. 2-1B)。アカパンカビゲノム DNA を鋳型として PCR を行った結果、増幅した約 1.4kb が増幅された。この増幅した DNA 断片を pT7Blue[®]ベクターにクローニングし、プラスミド pYK10 を作製した。クローニングした DNA 断片は塩基配列を決定し、データベース上の *ncRAD10* 遺伝子の塩基配列と比較した結果、クローニングした断片が *ncRAD10* 遺伝子断片であること確認した。

次に、アカパンカビへ *ncRAD10* 遺伝子を形質転換するためのベクターの作製を行った。pYK10 プラスミドから *ncRAD10* 遺伝子を含む約 1.4kb の *Kpn*I/*Xba*I 断片を切り出し、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子を含むベクター pCB1003 の *Kpn*I/*Xba*I 部位にサブクローニングし、pYK10-T を作製した。pYK10-T プラスミドをアカパンカビ野生株 (C1-T10-37A) に形質転換し、抗生物質ハイグロマイシン B 耐性を示す形質転換体を単離した。アカパンカビは、一つの細胞内に複数の核を持つため、シングルコロニー単離を数回繰り返し、形質転換体をホモカリオン化した。そのうち YK-1A 株を交雑に用いた。

作製した形質転換体 (YK-1A) と野生株 (C1-T10-28a) を交雑させ、遺伝子破壊を行った。得られた子孫株をスポットテストにより紫外線に対する感受性を調べた結果、感受性を示した *ncRAD10* 破壊株の候補株 (TN-B1-2) を得た。

この紫外線感受性株 (TN-B1-2) のゲノム DNA を抽出し PCR により *ncRAD10* 遺伝子領域を増幅させ、RFLP により確認を行った。野生株と紫外線感受性株 (TN-B1-2) 間の断片を確認した結果、制限酵素 *A*lw21 I で処理したバンドパターンに野生株との差異が見られ、また紫外線感受性株 (TN-B1-2) の *ncRAD10* 遺伝子部位の塩基配列を調べたところ、多数の点突然変異を確認した。さらに *ncRAD10* 遺伝子を含むアカパンカビゲノムライブラリー pMOcosX cosmid Library [Orbach and Sachs, 1991] の G24:B1 を紫外線感受性株 (TN-B1-2) に形質転換させたところ、紫外線、4NQO に対する感受性が相補された。よって、紫外線感受性株 TN-B1-2 を得た。

ハイグロマイシン B に対するスポットテストとサザンハイブリダイゼーションの結果より、*ncRAD10* 破壊株 TN-B1-2 株は、RIP 誘発時に導入した外来遺伝子 pYK10-T (*ncRAD10* 遺伝子の一部、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子) が残存していたため、野生株との戻し交雑により外来遺伝子の除去を行い、TNK-CT-20A 株および TNK-CT-1a 株を得た。戻し交雑時に再度 RIP が生じた可能性があったため、*ncRAD10* 遺伝子領

域の塩基配列を調べたところ、点突然変異の箇所が *ncRAD10* 破壊株に生じていた位置よりもさらに増加していた。その結果 75 箇所のアミノ酸が置換されており、N 末端側 26 番目のアミノ酸にナンセンス変異が生じており、*ncRAD10* 破壊株の機能は不活性化していると考えられた。

2-3-3 *mus-44* 変異株の変異原感受性

ncRAD10 変異株の紫外線および環境変異原 (4NQO, MMS, MNNG, CPT, HU, BLM) に対する感受性をスポットテストにより調べた (Fig. 2-2A)。4NQO (4-nitroquinoline 1-oxide) は、DNA 内の塩基に嵩高い付加物を生じ、DNA 二重らせんに歪みを生じさせる変異原であり、紫外線による損傷と同様に NER 経路により修復されることが知られている。MMS (*methyl methane sulphonate*) と MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) は、塩基にアルキル基を付加する変異原であり、1 本鎖切断も生じる。CPT (Camptothecin) はトポイソメラーゼ I 阻害剤で DNA 一本鎖切断を誘発し、HU (hydroxy-urea) は複製阻害剤、BLM (bleomycin) は、DNA に二本鎖切断を生じる変異原である。*ncRAD10* 変異株は、紫外線と 4NQO に対して感受性を示したが、その他の変異原 (MMS, MNNG, CPT, HU, BLM) に対しては顕著な感受性を示さなかった。この変異原感受性のパターンは、NER 変異株である *mus-38* 変異株と同様の感受性パターンを示すことが明らかとなった。*ncRAD10* 遺伝子変異株が、紫外線と 4NQO に対して感受性を示したので、アカパンカビの命名法に従って、*ncRAD10* 遺伝子を *mus-44* (MUtagen Sensitive) 遺伝子と改名した。

mus-44 変異株の紫外線に対する感受性はさらに詳細に調べるため、生存曲線を作成した (Fig. 2-2B)。*mus-44* 変異株は野生株に比べて紫外線に対する感受性が高く、照射量 50J/m² で野生株と顕著な差がみられ、250J/m² において 1%以下の生存率であった (Fig. 2-2B)。また既に解析されていた NER 変異株である *mus-38* 変異株と同程度の紫外線感受性を示した。紫外線に対し感受性を示すことから、紫外線により主に誘起される CPDs、6-4PPs の DNA 損傷を除去する修復系に関与する遺伝子であることが予想された。また、ヒトや出芽酵母では、XPF-ERCC1、Rad1-Rad10 タンパク質は複合体を形成し、ヌクレアーゼとして機能していることが報告されていることから、*ncRAD10* である *mus-44* は、ヒト XPF、出芽酵母 Rad1 に相同な *mus-38* 遺伝子産物と複合体を形成することが予想され、紫外線に対する感受性も同程度であると考えられた。

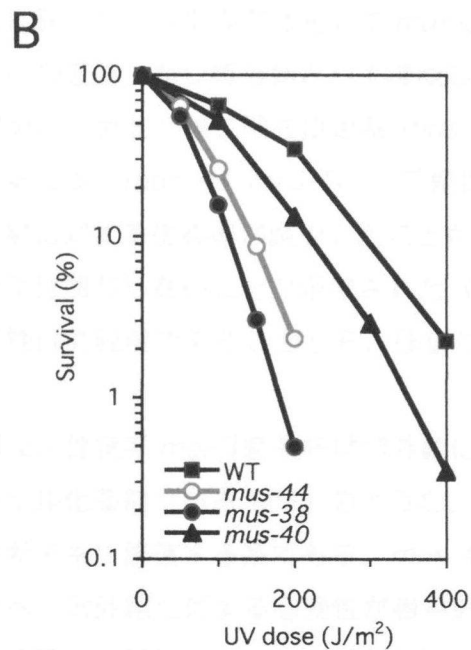
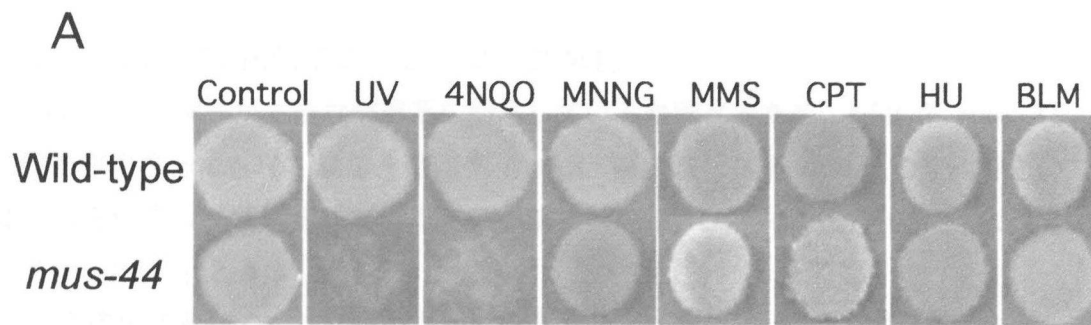


Fig. 2-2. *mus-44* 変異株の変異原に対する感受性と紫外線に対する生存率

(A) *mus-44* 変異株は紫外線、4NQO に感受性がみられたが、その他の変異原には感受性を示さなかった。すでに解析されている NER 変異株 *mus-38* と同様な表現型であることが明らかになった。

(B) *mus-44* 変異株は野生株よりも顕著な感受性を示し、これまで解析されていた *mus-38* 変異株に近い感受性を示した。

2-3-4 *mus-44* 遺伝子のエピスタシス解析

mus-44 変異株が主要な修復系に関与しているか調べるため、NER 系 *mus-38*、第二除去修復系 *mus-18*、組換え修復系 *mei-3*、複製後修復系 *Uvs-2* の変異株との二重変異株を作成し、紫外線に対する生存曲線を調べ、*mus-44* 遺伝子のエピスタシス解析を行った(Fig. 2-3)。

NER 遺伝子としてすでに単離されている *mus-38* 変異株と *mus-44* 変異株は、紫外線に対する感受性がほとんど同じであった(Fig. 2-3A)。*mus-44 mus-38* 二重変異株の紫外線に対する生存率は極めて *mus-38* 変異株の生存率に近く、*mus-44* は *mus-38* と同一の経路、かつ複合体として機能していることが予想された。

アカパンカビの第二除去修復系 *mus-18* 変異株は、*mus-44* 変異株と同程度の生存率であるが、*mus-44 mus-18* 二重変異株はそれぞれの単一変異株に比べ、相乗的に紫外線に対する生存率が減少したことから、アカパンカビの第二除去修復には *mus-44* 遺伝子は関与しないことが示唆された (Fig. 2-3B)。しかしながら、紫外線に対する感受性は同程度であることから、修復における重要度は同レベルであることが推測される。

組換え修復系 *mei-3* 変異株は紫外線に対して野生株よりも若干感受性を示すものの、アルキル化薬剤である MMS のような、DNA のメチル化や、放射線による DNA 二本鎖切断を主に修復する系である。*mus-44 mei-3* 二重変異株はそれぞれの単一変異株と比べ、紫外線に対する感受性が相乗的に増加したことから、*mus-44* 遺伝子は組換え修復系には関与しないことが示された (Fig. 2-3C)。複製後修復系は複製に伴い DNA 損傷を修復する系であり、複製そのものが DNA 損傷を解消するのが特徴である。複製後修復系 *Uvs-2* 変異株は、紫外線に対して *mus-38, mus-18* 変異株よりも非常に高い感受性を示す。これは紫外線損傷を修復する経路だからではなく、紫外線により受ける損傷が複製そのものに影響を与えるからである。*mus-44 Uvs-2* 二重変異株は第二除去修復系、組換え修復系との二重変異株と同様に、紫外線に対し、それぞれの単一変異株よりも非常に高い感受性が確認され、*mus-44* 遺伝子は複製後修復系にも関与しないことが示された (Fig. 2-3D)。

以上の結果から、*mus-44* 遺伝子は *mus-38* と同様に NER に関与している事が示され、第二除去修復、組換え修復、複製後修復には関連がないことを確認した。

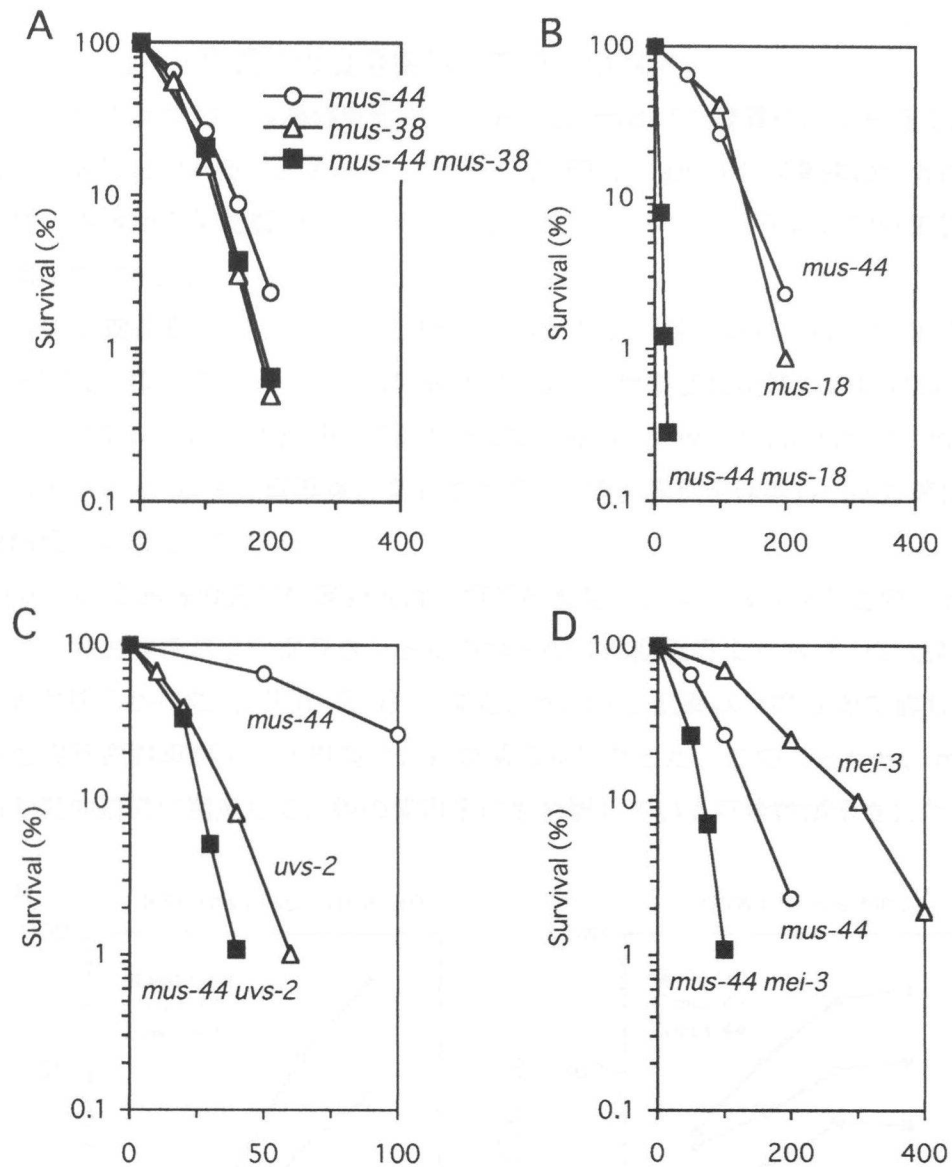


Fig. 2-3. *mus-44* 変異株のエピスタシス解析

(A)NER 系 *mus-38* 変異株、(B)第二除去修復系 *mus-18* 変異株、(C)組換え修復系 *mei-3* 変異株、(D)複製後修復系 *uvs-2* 変異株との二重変異株の紫外線に対する感受性をそれぞれ調べた。

2-3-5 *mus-44* 変異株の復帰突然変異頻度の測定

mus-44 変異株の紫外線感受性が、*mus-40*, *mus-43* 変異株よりも高く、*mus-38* 変異株と同程度であることを確認した(Fig. 2-2B)。*mus-44* 変異株の紫外線に対する感受性の相違が突然変異の誘発に与える影響を、*pan-2* 遺伝子座の紫外線誘発復帰突然変異率で調べた。

復帰突然変異頻度の測定は、2 種類のパントテン酸要求株(*pan-2* (B36), *pan-2* (OGW1))を用いて行った。*pan-2* (B36)は塩基置換型変異を持つのに対して、*pan-2* (OGW1)はフレームシフト型の変異を持っている (Ogawa, unpublished data)。これら二つの株と *mus-44* 変異株と交配させて、二重変異株を作製し、紫外線に対する復帰突然変異頻度を測定した。

mus-44 変異株の突然変異頻度は、塩基置換型、フレームシフト型の両テストにおいて、野生株をバックグラウンドにもつ株の突然変異率よりも 2~3 倍程度高くなることが明らかになった (Fig. 2-4)。また、*mus-43* 変異株 (第 3 章で詳しく述べる) よりも突然変異率が 2~3 倍高いことが明らかになった。このことから、*mus-44* は突然変異の誘発に関連して、他の修復系にも影響している可能性が示された。

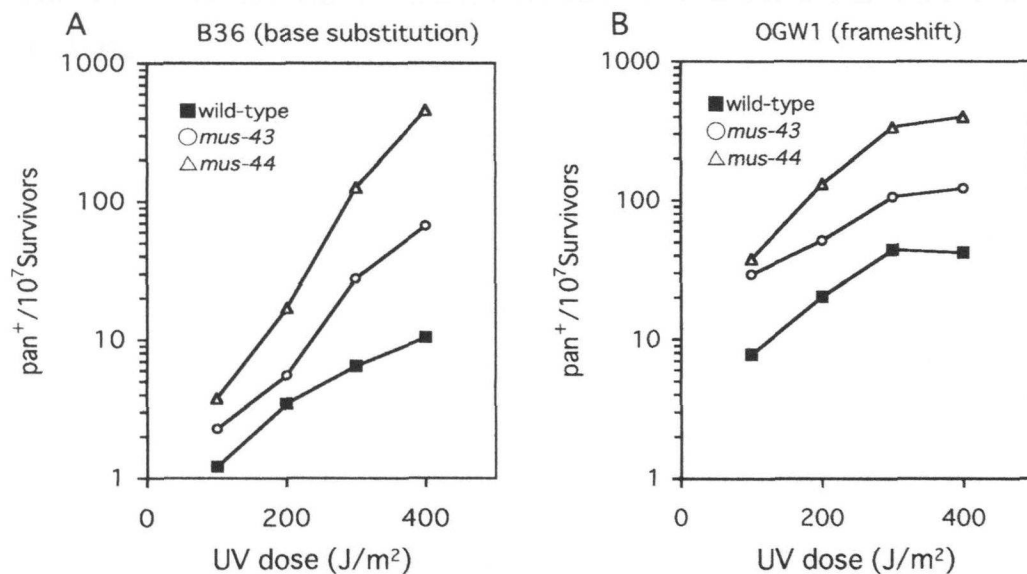


Fig. 2-4. *mus-43*, *mus-44* 変異株の復帰突然変異頻度

パントテン酸要求株 *pan-2*(B36)と *pan-2*(OGW1)を用いて *mus-43*, *mus-44* 変異株の突然変異の誘発をみた。

(A)*pan-2*(B36)は *pan-2* 遺伝子内の塩基置換による変異株である。(B)*pan-2*(OGW1)はフレームシフト型の変異が導入されている変異株である。*mus-43* 変異株と *mus-44* 変異株は共に野生株と比べて突然変異頻度が上昇した。*mus-44* 変異株は *mus-43* 変異株よりも突然変異を誘発することから、他の修復系にも関与する可能性も考えられる。

第3章 アカパンカビ *ncRAD14* 遺伝子の解析

3-1 緒言

出芽酵母の NER 関連遺伝子である *RAD14* がコードする Rad14 タンパク質は、NER の GGR と TCR の損傷認識後に損傷 DNA に結合し、続いて損傷ヌクレオチドの切除が行われる。ヒトの XPA タンパク質と出芽酵母の Rad14 タンパク質は DNA に結合するタンパク質にみられる Zinc finger モチーフがアミノ酸配列中に確認されており、NER における重要なタンパク質であることが報告されている[Hess, 1998]。

ヒトの XPA タンパク質は全長 273 残基より構成されているが、Zinc finger モチーフを含む中央ドメイン(Met98-Phe219, 122 残基)は損傷 DNA に選択的に結合し、また遺伝子複製にも関与するタンパク質 RPA(replication protein A)との結合能を有する最小ドメインであることがすでに報告されている[Kuraoka, 1996]。出芽酵母においても RPA に相同な遺伝子 RFA がすでに単離されており、アカパンカビにおいても RFA1, RFA2, RFA3 が存在する。

ヒト XPA、出芽酵母 *RAD14* 変異体は損傷ヌクレオチドの切除を行う過程で重要な因子であり、紫外線に対する感受性が高い。アカパンカビにおいて、ヒト XPA、出芽酵母 *RAD14* に相同な遺伝子破壊株を作成し、NER に与える影響を解析することを目的とした。

3-2 材料と方法

[使用菌株とベクター]

本実験で使用したアカパンカビの株とその遺伝子型を Table 3-1 に示した。アカパンカビ野生株として、C1-T10-37A と C1-T10-28a をそれぞれ使用した[Tamaru and Inoue, 1989]。 *mus-38* 変異株 (CZ-272-16A, CZ-272-5a)、 *mus-18* 変異株 (C2-T40-9A)、 *mei-3* 変異株 (FGSC2764A)、 *uvs-2* 変異株 (74-OR244-3A)、 *pan-2* 変異株 (FGSC4105A, C2-S2-8A) は、埼玉大学遺伝学研究室より頂いた。プラスミド構築に使用した大腸菌の株とその遺伝子型を Table 3-2 に示した。PCR 増幅 DNA 断片のクローニングには pT7Blue® (Novagen)を使用し、アカパンカビの形質転換には pCB1003 をベクターとして用いた。pCB1003 プラスミドには、アカパンカビ細胞内で機能する選択マーカーとしてハイグロマイシン B 耐性遺伝子(*hygB^r*)が挿入されている。pMI14-T は pCB1003 から *EcoRI* により切り出した約 1.5kbp のハイグロマイシン B 耐性遺伝子(*hygB^r*)断片を pMI14 に挿入して作製した。アカパンカビゲノムライブラリー (pMOcosX) [Orbach and Sachs, 1991]は、FGSC(Fungal Genetics Stock Center)より入手した。

Table 3-1. Strains of *N.crassa* used in this study

Strain number	Genotype	Source/reference
C1-T10-37A	A	Tamaru and Inoue (1989)
C1-T10-28a	a	Tamaru and Inoue (1989)
FGSC4105A	A <i>pan-2</i> (B36)	FGSC
C2-S2-8a	a <i>pan-2</i> (OGW1)	Kawabata et al.(2008)
CZ-272-16A	A <i>mus-38</i>	Ishii et al.(1998)
CZ-272-5a	a <i>mus-38</i>	Ishii et al.(1998)
C2-T40-9A	A <i>al-2 pan-2 cot-1 mus-18A</i>	Ishii et al.(1991)
74-OR244-3A	A <i>al-2 pan-2 cot-1 uvs-2</i>	De Serres et al. (1980)
FGSC2764A	A <i>mei-3</i>	FGSC
MST-CT-1A	A <i>mus-43^{RIP}</i>	This study
MST-CT-1a	a <i>mus-43^{RIP}</i>	This study
MST-B36-3A	A <i>mus-43^{RIP} pan-2</i> (B36)	This study
MST-OGW-14a	a <i>mus-43^{RIP} pan-2</i> (OGW1)	This study
MST-me3-3A	A <i>mei-3 mus-43^{RIP}</i>	This study
MST-m18-2a	A <i>mus-18 mus-43^{RIP} pan-2</i>	This study
MST-m38-8A	A <i>mus-38 mus-43^{RIP}</i>	This study
MST-u2-5A	A <i>uvs-2 mus-43^{RIP}</i>	This study

FGSC, Fungal Genetic Stock Center

Table 3-2. Strains of *E. coli* used in this study

Strain number	Genotype
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), e14- (mcrA-), supE44, relA1, Δ (lac-proAB)/F' [traD36, proAB+, lacIq, lacZ Δ M15]</i> <i>F-, φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169,</i>
<i>E. coli</i> DH5α	<i>deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1</i>

[培養]

アカパンカビの培養には、VM 培地（1×Vogel 最少培地，1.2 %（w/v） ショ糖）を使用し、寒天培地には 1.2 %（w/v） 寒天を加えた[Vogel, 1964]。ハイグロマイシン B 耐性の形質転換体の選抜には、最終濃度 500 μg/ml のハイグロマイシン B を培地に加えて行った。アカパンカビの分生子形成は、グリセロール完全培地（1×Vogel 最少培地，1 %（v/v） グリセロール，0.25 %（w/v） yeast extract，0.1 %（w/v） カザミノ酸，0.5 %（w/v） malt extract，1 %（v/v） ビタミンストック溶液，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて、1 週間培養することで行った。アカパンカビの交配は、SC 培地（1×Westergaards'合成培地，1.2%（w/v） ショ糖，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて行った。アカパンカビのコロニー形成には、コロニー形成培地（1×Vogel 最少培地，0.2 %（w/v） ショ糖，1 %（w/v） ソルボース，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて行った。基本培地の成分は、Table 3-3 にまとめた。

大腸菌の培養には、LB 培地（1 %（w/v） バクトトリプトン，0.5 %（w/v） 酵母エキス，1 %（w/v） 塩化ナトリウム）を使用し、寒天培地には 1.2 %（w/v） 寒天を加えた。アンピシリン耐性の選抜には、アンピシリンを最終濃度 50 μg/ml になるように加えて行った。

Table 3-3. Mediums used in this study

50×Vogel's 最少培地(1000ml 中)	
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	125g
KH_2PO_4	250g
KH_4NO_3	100g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5g
ビオチン水溶液	25ml
Vogel's 微量元素液	5ml
Vogel's 微量元素液(100ml 中)	
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25g
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05g
H_3BO_3	0.05g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05g
ビオチン水溶液 (1000ml 中)	
Biotin	40mg
ビタミンストック溶液 (100ml 中)	
サイアミン (ビタミン B1)	10mg
リボフラビン (ビタミン B2)	5mg
ピリドキシン (ビタミン B6)	5mg
パントテン酸カルシウム	50mg
パラアミノ安息香酸	5mg
ニコチン酸アミド	5mg
塩酸コリン	100mg
葉酸	1mg
イノシトール	100mg
10×Westergaards' 合成培地(1000ml 中)	
KNO_3	10g
KH_2PO_4	10g
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
NaCl	1g
CaCl_2	1.3g
Vogel's 微量元素液	10ml
ビオチン水溶液	10ml

[DNA 操作]

(i) 基本的な遺伝子工学的手法

プラスミド DNA の少量調整などの基本的な遺伝子工学的手法は、Sambrook らによる方法 [Sambrook et al., 1989]に従った。大腸菌の形質転換は、Perbal の実験書 [Perbal, 1988]に従った。コンピテント細胞作製には、JM109 株、DH5 α 株を使用した。精製した DNA の確認はアガロース電気泳動により行なった。

(ii) サザンハイブリダイゼーション

アガロースゲルからメンブレンへ DNA を移行するために、キャピラリートランスファーまたは VacuGene™ blotting system (Pharmacia)を使用した。メンブレンは、Hybond-N⁺(Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。DIG によるプローブの標識法として、ランダムプライム法を用いた。ランダムプライム法には、DIG ハイプライム(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を使用した。メンブレンとプレハイブリダイゼーション溶液を耐熱性のタッパーに入れ、68℃で 2~3 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、熱変性させた標識プローブをタッパーに加え、15 時間以上 68℃で保温した。

ハイブリダイゼーション後の検出は、基質として NBT(ニトロブルーテトラゾリウムクロライド)と BCIP (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-リン酸)を用いた発色反応により行なった。まず、メンブレンを室温で No.1 洗浄液(2×SSC、0.1% SDS)で 5 分間、2 回洗浄し、次に 68℃で No.2 洗浄液(0.1×SSC、0.1% SDS)で 15 分間、2 回洗浄した後、Wash Buffer[0.3% Tween-20® in Buffer1(0.1M マレイン酸、0.15M NaCl ; pH7.5)]で 1 分間洗浄した。その後、Blocking Buffer (1% Blocking stock solution in Buffer1)で 30 分間インキュベーションした後、20ml の希釈抗体溶液(150mU AP 標識抗ジゴキシゲニン抗体、Fab フラグメント/ml Buffer)で 30 分間インキュベーションした。次に、Wash Buffer で 15 分間、2 回洗浄した後、メンブレンを検出 Buffer(100mM Tris-HCl、100mM NaCl、50mM MgCl₂ ; pH9.5)で 2 分間平衡化した。そして、暗冷下で、10ml の発色溶液(200 μ l NBT/BCIP 溶液/10ml 検出 Buffer)と共にメンブレンをインキュベーションし、発色反応させて検出した。

(iii) PCR

PCR 法による *ncRAD10* 遺伝子断片の増幅には、Taq polymerase を用いた。0.2ml のマイクロチューブに、鋳型 DNA (0.05 μ g)、プライマー (0.5 μ M)、5 μ l の 10×緩衝液、5 μ l の 25mM 塩化マグネシウム溶液、1 μ l の Taq polymerase を加

えて、水(D.W.)で 50 μ l になるようにした。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C 1 分間 (変性)、57 $^{\circ}$ C 1 分間 (アニーリング)、72 $^{\circ}$ C 1 分間 (DNA の伸長) を 1 サイクルとして 30 回繰り返した。すべてのプライマーの合成と精製は、日本バイオサービス社に依頼した。

(iv) DNA 塩基配列の決定

DNA 断片は、ALFexpressTM AutoCycleTM Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて伸長反応を行ない、塩基配列自動決定装置 ALFexpress シークエンサー (Amersham Pharmacia Biotech) によって、塩基配列を決定した。決定された DNA 断片の塩基配列は GENETYX-WIN/ATSQ (ソフトウェア開発) により解析を行なった。

[遺伝子の不活化]

RIP (Repeat-induced point mutations) [Selker, 1990] を利用して、目的とする遺伝子の不活化を行なった。まず、不活化させる遺伝子の一部分の DNA 断片 (*ncRAD14* の約 700bp の断片) を PCR により増幅し、pT7Blue ベクター (Novagen) へ挿入して pMI14 を作成した。pCB1003 ベクターから *EcoRI* 処理により切り出したハイグロマイシン B 遺伝子を pMI14 プラスミドにの *EcoRI* サイトに導入して pMI14-T プラスミドを作成した。

この pMI14-T プラスミドを使用して、アカパンカビ野生株 (C1-T10-37A) を形質転換した。次に、ハイグロマイシン B 抵抗性の形質転換体を単離し、これを交配型の異なる野生株 (C1-T10-28a) と交雑することによって RIP を誘発した。

RIP による点突然変異生成の確認は、交雑によって生じた子嚢胞子を単離し DNA を抽出し、この DNA に含まれる *ncRAD14* 遺伝子の制限酵素認識部位が野生株と比較して変化しているかどうかを指標として行なった。回収したゲノム DNA と野生株のゲノム DNA それぞれを鋳型とし、RIP による遺伝子の不活性化のための遺伝子断片の単離に用いたプライマーを使い、PCR を行なった。増幅した遺伝子断片を制限酵素で処理し、電気泳動を行なった。増幅した遺伝子断片を任意の制限酵素で処理した後、電気泳動を行なった。これにより検出される DNA 断片パターンが野生株と異なる制限酵素を確認した。RIP による点突然変異生成を確認するため、PCR によって増幅させた遺伝子断片の塩基配列を決定し、点突然変異を生じた子孫株を *RAD14* ホモログ遺伝子破壊株、*ncRAD14* 変異株として以後の実験に用いた。

[アカパンカビの形質転換]

アカパンカビの形質転換は、Vollmer と Yanofsky の方法 [Vollmer and Yanofsky, 1986] 及び Tomita らの方法 [Tomita et al., 1993] をもとに行なった。

分生子の発芽を確認した後、1M Sorbitol 溶液で洗浄・遠心した。ペレット状にした分生子を、1M sorbitol で 2mg/ml に調製した LYSING ENZYMES From *Trichoderma harzianum* (SIGMA) 2ml に懸濁し、30℃で低速振とうをした。酵素反応開始から約 60 分経過後、分生子の一部をサンプリングし、顕微鏡下でサンプルに水を加えることにより細胞破壊が起きることを調べ、スフェロプラスト化の確認を行なった。その後スフェロプラストを 1M sorbitol 溶液で 2 回洗浄し、CaCl₂ sol. [50mM CaCl₂, 1M sorbitol, 50mM Tris-HCl(pH8.0)] で洗浄したのち、CaCl₂ sol. 1.2ml、PEG sol. [40% PEG4000, 50mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl(pH8.0)] 400 μ l 加え、スフェロプラスト溶液とした。スフェロプラスト溶液 30~50 μ l と 5 μ l ヘパリン溶液 (heparin 5mg/ml in CaCl₂ sol.)、2 μ l スペルミジン溶液 (50mM spermidine-3HCl)、3~5 μ l DNA 溶液を混合し、氷上で 30 分間静置した後、PEG sol. 300 μ l 加え、20 分間室温で静置した。その後、溶解して 50℃で保温しておいた上層培地と混合し、ハイグロマイシン B (0.5mg/ml) を含む下層培地上に拡げ、30℃で 2 日間培養した。

単離した形質転換体をホモカリオンにするため、分生子を 1ml の滅菌水に懸濁したのち、ハイグロマイシン B を含むコロニー形成用培地に加え、シャーレ (φ90mm) に拡げた。30℃で 2 日間培養した後、ハイグロマイシン B 耐性を指標にして、形質転換された核のみを持つ株を選別し以後の解析に用いた。

[アカパンカビの遺伝学的解析]

アカパンカビの交雑など遺伝学的解析は Davis と de Serres の方法 [Davis and de Serres, 1970] に従って行なった。

[アカパンカビからのゲノム DNA の調整]

アカパンカビからのゲノム DNA の調整は、Irelan らの方法 [Irelan et al., 1993] に従った。30ml の液体培地に少量の菌糸を植え、30℃で 2 日間振とうした後、培養液を濾過して菌糸を集めた。この菌糸を液体窒素で瞬間冷凍して、ゲノム DNA の調整に用いた。DNA は 260nm で吸光度を測定して定量した。定量後、サザンハイブリダイゼーションやゲノム DNA を鋳型とする PCR に用いた。

[スポットテスト]

アカパンカビの変異原に対する感受性を調べるために、スポットテストを行なった。培地として、コロニー形成培地を用いた。

変異原 4NQO、MMS はオートクレーブ滅菌後の培地が 60℃以下になった時に加え、一様にシャーレにひろげた。試験する株の分生子を滅菌水に懸濁し、この懸濁液をプレート状にひろげた寒天培地上にパスツールピペットを用いてスポットした。28℃で 2 日間培養後、菌糸の増殖を調べた。紫外線に対する感受性は、変異原を添加していないプレート上に分生子の懸濁液をスポットした後、75~225J/m²の紫外線を照射し、遮光した暗条件下で 28℃、2 日間培養し、菌糸の増殖を調べた。

[アカパンカビの変異原感受性]

変異原処理したアカパンカビの生存率の測定は、Inoue と Ishii の方法 [Inoue and Ishii, 1984] に従った。

アカパンカビ分生子を 1/15M リン酸緩衝液[pH7.0]に懸濁し、1×10⁶ 個/ml の懸濁液とした。これを 9cm シャーレに 20ml ずつ加え、そこに紫外線を照射した。紫外線は 2.5J/m².sec の強度で照射した。照射後、100μl 採取し希釈した後、1000 個をコロニー形成用寒天培地に混ぜて 15cm シャーレにひろげ、30℃で 3 日間培養して現れたコロニーを数え、これをもとに生存率を求めた。

[復帰突然変異頻度の測定]

突然変異頻度は *pan-2* 遺伝子座の復帰突然変異頻度を指標として測定した。突然変異頻度のテスター株として使用した *pan-2* 変異株の対立遺伝子 B36 および OGW-1 は、それぞれ *pan-2* 遺伝子座の異なる部位に塩基置換型とフレームシフト型の突然変異をもつ株である [Ogawa, unpublished data]。これらの株と *ncRAD10*, *ncRAD14* 変異株を交雑し、*ncRAD10 pan-2*, *ncRAD14 pan-2* 二重変異株を作製した。紫外線照射後の 1×10⁷ 個の分生子をコロニー形成のための培地と混合してシャーレにまいた。紫外線誘発突然変異頻度は、パントテン酸を含むコントロール培地でのコロニー数に対するパントテン酸を含まない培地でのコロニー数によって算出した。

3-3 結果と考察

3-3-1 アカパンカビ *ncRAD14* 遺伝子の検索

出芽酵母 *RAD14* 遺伝子のホモログをアカパンカビのゲノムプロジェクトデータベース Whitehead Institute for Biomedical Research (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>) を利用して検索を行った結果、出芽酵母 *Rad14* に 32%、human XPA と 38% の相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子 NCU8742.3 が存在した。出芽酵母 *Rad14*, ヒト XPA のアミノ酸配列を用いてアカパンカビゲノムデータベース検索した結果、E value が 1×10^{-1} 乗以上のタンパク質は NCU8742.3 以外には存在せず、出芽酵母 *Rad14* ホモログとして、この遺伝子をアカパンカビ *ncRAD14* と命名した。

ncRAD14 遺伝子は、データベースのデータより第 II 連鎖群左側に位置することが判明した。この領域には、DNA 修復関連遺伝子としては *mus-23* が存在した。しかし、この遺伝子はすでにその塩基配列が決定されており、今回明らかにした *ncRAD14* 遺伝子とは明らかに異なっており、*ncRAD14* 遺伝子は新規の修復遺伝子であることが明らかとなった。*ncRAD14* 遺伝子中には 2 つのイントロン (92bp と 129bp) が存在し、イントロンを除いた遺伝子の全長は 1527bp であった。塩基配列から予想されるタンパク質は 435 アミノ酸残基であり、アミノ酸配列から予想されるタンパク質の分子量は 48kDa であった。

予想される *ncRAD14* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列を Fig. 3-1A に示した。この遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、ヒト XPA および出芽酵母 *Rad14* タンパク質のアミノ酸配列と比較したところ、中盤以降の zinc finger ドメインを含む領域で高い相同性が保存されていた (Fig. 3-1B)。この領域は、ヒトや出芽酵母の研究から、DNA 結合に重要な領域であることが知られており、今回発見した *ncRAD14* タンパク質もまた DNA 結合タンパク質である可能性が高く、出芽酵母 *RAD14* 遺伝子の機能的ホモログであると考えた [Friedberg et al., 2006]。*ncRAD14* 遺伝子にコードされるタンパク質全体では、ヒト XPA タンパク質と 38% の相同性があった。

ATGGAACGGGCGTCCACTCCTCCAGCTCAAGCGCGCCGATCAACCCGATCAACAACCGCA 60
 M E R A S T P P A Q A R R S T R S T T A

 GCACGTCCACCATCACCACCAACTCCCCTGCGGACAGGCGTCGCATAgtaaggcactcc 120
 A R P P S P P T P A A D R R R I

 Attcagcctggctttatatccatcgcaccaaaatccttaaaaaaaaaaagataaactaacc 180

 aatcctccacgtccatcagGAAGAATCCCGTCTTCGCGTCAAAGACCTCCGCACCCAACG 240
 E E S R L R V K D L R T Q R

 CGAAGCCGACCACCGCGCCCGGCATCCCTCTCCCTCCGACTCTCTCCACGCACTGC 300
 E A D H R A A G I P L P S D S L P R T A

 GTCCGGCATCGCCGCCACCGATGACATCCAAGTAGCCGGCGCCCGGTGCGCGGGCGGC 360
 S G I A A T D D I Q L A G A A G R A A A

 GGCGGCCTCTCGCAAGCGTCCGTTACCTCGATCTCGCGAAATGACGTACCGGCTAGTAA 420
 A A S R K R P F T S I S R N D V P A S N

 CCGGGACGCTCGCACGGCGACAGGGACCAATGACAGAAAAGATGGCAACAACGGCAACGG 480
 R D A R T A T G T N D R K D G N N G N G

 CAACGGCGACGCAGGGGGAAGCTTGCCCCCATCTCGCGCAAGTTCACTAAATACGTCGA 540
 N G D A G G S L P P I S R K F T K Y V D

 CTACAACCTTTAGCGCCATGACGGACACCAAGGGCGGGTTCCTGTCGTTGGAAGATGATCC 600
 Y N F S A M T D T K G G F L S L E D D P

 GTTCAACAAGCACTTGTCCGTTCCACGAAGCCGGGACAGCCAGAACAAGAACAAAAGCC 660
 F N K H L S V P T K P G Q P E Q E Q K P

 GGCGCACATGACGGCTGCGGAGTGGGAGCGGATGCAGTTGATAAGGAAGCTGCAGCGGAC 720
 A H M T A A E W E R M Q L I R K L Q R T

(To be continued)

Fig. 3-1A アカパンカビ *ncRAD14* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

TAAAGCCGGGCCGTACGAGCCGGGATTGAGTGTGCTGACGGATAATAAGGAGACGAAGAA 780
K A G P Y E P G L S V L T D N K E T K K

GTGCAGAGAGTGTGGGAGTCTGGAAATCGACTTTGTGTGGGCAGAGACGTTTGGGTGCGC 840
C R E C G S L E I D F V W A E T F G C A

CGTGTGTGGCAAGTGTAAAGAGCGGTTCCCGGAGAAGTACAGTTTGTTGACCAAGACGGA 900
V C G K C K E R F P E K Y S L L T K T E

GGCGAAGGAGGATTATTTGTTGACTGATCgtgagttttttttttttttttttttttttttttt 960
A K E D Y L L T D P

tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt 1020

catgatgatacgagttgctgacgctggtttgctacagCTGAAGTCAAAGACCCCGAAGTC 1080
E L K D P E L

CTCCCTCACCTCTCCAAACCGAACCCGCACAAATCCCACTGGCACGACATGATGCTCTTT 1140
L P H L S K P N P H K S H W H D M M L F

CTACGATACCAGGTCGAGGAATATGCGTTCAATGTCAAGTGGGGGTCGGCGGAGGCTCTG 1200
L R Y Q V E E Y A F N V K W G S A E A L

GATGCCGAGTTTGAGAAGCGTGAGCAGGACAAGAAGAGAAGGAAGGAGGCCAAGTTCAAG 1260
D A E F E K R E Q D K K R R K E A K F K

GAGAAGTTGCTTGACTTGAAGAGGAAGACAAGGACAGAGGCGTTTAGAAGGAACACGGGC 1320
E K L L D L K R K T R T E A F R R N T G

AAGTTGGGCGGGATAGCAGGGGGAGATGGTGGTGGTGGTGGTGGTAGTTCAATAGGGAGG 1380
K L G G I A G G D G G G G D G S S I G R

AGAGGAAAAGCGACCAAGTTTGGGGATACGATCAATAATGGGGGGAAGCATGTCCATGAA 1440
R G K A T K F G D T I N N G G K H V H E

(To be continued)

Fig. 3-1A アカパンカビ *ncRAD14* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

TGGGGGAGGACGGTTGAGAATGAGGAGGGGATGACGGTCAAGACGTGTACGACTTGTGGG 1500
W G R T V E N E E G M T V K T C T T C G

ATGGAGGTTGAGGAGTTGGAGTTTTAG 1527
M E V E E L E F *

Fig. 3-1A アカパンカビ *ncRAD14* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

アカパンカビゲノムデータベースより、出芽酵母 *RAD14* タンパク質に相同性を持つ NCU08742.3 が存在した。この遺伝子は全長 1527 塩基、435 アミノ酸からなるタンパク質をコードすることが予測され、遺伝子中にイントロンが 2 箇所含まれていた。上図の小文字はイントロンを、青線はイントロンのコンセンサス配列を、青矢印は設計したプライマーの位置を示した。赤文字の C は zinc finger モチーフで保存されているシステインを示した。

ncRAD14 MERASTPPAQARRSTRSTTAARPPSPPTAADRRRIEESRLRVKDLRTQREADHRAAGIP
humanXPA -----MAAADGALPEAAALEQPAELPASVRASIERKQRQALMLRQARLAAR-----
scRad14 -----MTPEQAKKLEANKRNAIERLRKRGILSSDQLNRIESRNEPLKTRPLAVTSGSN-----

* * *

ncRAD14 LPSDSLPR TASGIAATDDIQLAGAAGRAAAAA SRKRPFTSISRNDVPASNRDARTATGTN

humanXPA -----PYSATAAAATGGMANVKAAP-----

scRad14 --RDDNAAAVHVPNHNGOP SALANTNTNTTSLYGSGVVDGSKRDASVLDKRPTDRIRPS

• • • • •

ncRAD14 DRKDGNNGNGNDAGGSLPPISRKFTKYVDYNFSAMTDTKGGFLSLEDDPFNKHLSVPTK
humanXPA -----KIIDTGGGFILEEEE-----
scRad14 IRKO-----DYIEYDFATMONLNGGYINPKDKLPNSDFTDDOE

* * * * *

ncRAD14 PGQPEQEQKPAHMTAAEWERMQLIRKLQRTKAGPYEPGLSVLTDNKETKKCRECGS-LEI
humanXPA ----EEEQKIGKVHVGPGPVMFEFD-----YVICECGK-EFM
scRad14 --FESEFGSKKOKLTLDWKKQEQLERKMLYENAPPE-----HISKAPKICIEHINIEM

ncRAD14 DFVWAETFGCAVCGKCKERFPEKYSLLTKTEAKEDYLLTDRELKDPE-LLPHLSKPNPHK

humanXPA DSYLMNHFDLPTCDNCRD-ADDKHKHLITKTEAKQEYLLKDCLEKREPPLKFIKKPNPH

scRad14 DPVLHDVFKLOVCKCKSCHEPEKYALLTKTECKEDYFLTPDELNDED-LFHRLKPNPHS

* * * * *

ncRAD14	SHWHDMMLFLRYQVEEYAFNVKWSAEALDAFEKREQDKKRRKEAKFKEKLLDLKRKTR
humanXPA	SQWGDMLKLYLKLQIVKRSLEV-WGSQEALEEAEVQRQENREKMKQKFKDKVKELRRAVR
scRad14	GTFARMOLFVRCVEEAFAFKK-WGGEGLDEEWORREEGKAHRREKKYKIKEMRLKTR

* * * * *

(To be continued)

Fig. 3-1B NCRAD14 のアミノ酸配列の比較


```

ncRAD14      TEAFRRNTGKLGGIAGDGGGGDGSSIGRRGKATKFGDTINNGGKHVHEWGRTVE--NEE
humanXPA      SSVWKRET-----IVHQHEYGPEN--LED
scRad14       AQEYTNRLREK-----KHGKAHIIHFSDPVDGGIDE
              :. : ..                      * *. : : : :

ncRAD14      G---MTVKTCTTCGMEVEEELF      435aa
humanXPA      D---MYRKTCTMCGHELTYEKM      273aa
scRad14       DGYQIQRRRCTDCGLETEEIDI      371aa
              . : : * * * * * . :

```

Fig. 3-1B NCRAD14 のアミノ酸配列の比較

アカパンカビ NCRAD14 とヒト XPA、出芽酵母 scRad14 とのアミノ酸配列を比較した。NCRAD14 はヒト XPA と 38%、出芽酵母と 32%の相同性があった。

3-3-2 RIP による *ncRAD14* 遺伝子破壊株の作製・解析

アカパンカビゲノムデータベースから入手した *ncRAD14* 遺伝子の塩基配列を基に *ncRAD14* 遺伝子の内部にプライマー *ncRAD14-F* (5-CCT GCT ATC CCG CCC AAC T-3) と *ncRAD14-R* (5-CAC ATG ACG GCT GCG GAG T-3) を設計した。この 2 種のプライマーとアカパンカビゲノム DNA を鋳型として PCR を行なった結果、約 700bp の断片が増幅された。この増幅した断片を pT7Blue® にクローニングし、プラスミド pMI14 を作製した。クローニングした PCR 増幅断片の塩基配列を決定した結果、アカパンカビゲノムデータベース上の *ncRAD14* 遺伝子の塩基配列と同じであり、PCR によりクローニングした断片が *ncRAD14* 遺伝子断片を含むことを確認した。

ncRAD14 遺伝子の解析にあたり、減数分裂時に核内の重複した配列部分に G:C→A:T の点突然変異をランダムに誘発する RIP (Repeat-Induced Point mutations) を利用して *ncRAD14* 遺伝子破壊株の作製を行った [Selker, 1990]。

ncRAD14 遺伝子破壊株を得るために、まず *ncRAD14* 遺伝子を重複して保持する形質転換体の作製を行った。pCB1003 遺伝子からハイグロマイシン B 耐性遺伝子を含む *EcoRI* 断片を切り出し、pMI14 プラスミドの *EcoRI* サイトに導入し、pMI14-T を作製した。

この pMI14-T をアカパンカビ野生株 (C1-T10-37A) に導入し、抗生物質ハイグロマイシン B 耐性を示す形質転換体を単離した。アカパンカビは一つの細胞内に複数の核を持つため、シングルコロニー単離を数回繰り返し pMI14-T が導入されている形質転換体をホモカリオン化し交雑に用いた。

作製した形質転換体を野生株 (C1-T10-28a) と交雑させることで、RIP による遺伝子破壊を行った。得られた子孫株をスポットテストによる紫外線感受性を調べた結果、紫外線に感受性を示す株を 3 株得 (MS-1-14, 16, 26) 得た。一番顕著な感受性が確認出来た株 (MS-1-14) を *ncRAD14* 遺伝子破壊株の候補として以後の実験に用いた。

ncRAD14 遺伝子内に RIP による点突然変異が生じているかを RFLP により確認したが、有意な差を確認できなかったため、*ncRAD14* 遺伝子内の塩基配列を決定して調べた。

紫外線感受性株 (MS-1-14) の *ncRAD14* 遺伝子の塩基配列を調べた結果、野生株と比較してスタートコドンの ATG の A から数えて 724 番目のグアニンがアデニンに置換されたのを始め、計 6 箇所シトシンからチミンへの置換による点突然変異を確認した。よって、これらの塩基置換により 212 番目のアラニンがトレオニンへ置換されたのを始め、302 番目のグルタミンが終止コドンになることが予想された (Fig. 3-2)。また、紫外線感受性株 (MS-1-14) に *ncRAD14* 遺伝子を持つゲノムライブラリーを形

質移入させたところ、紫外線感受性が相補された。以上より紫外線感受性株(MS-1-14)を *ncRAD14* 破壊株とした。

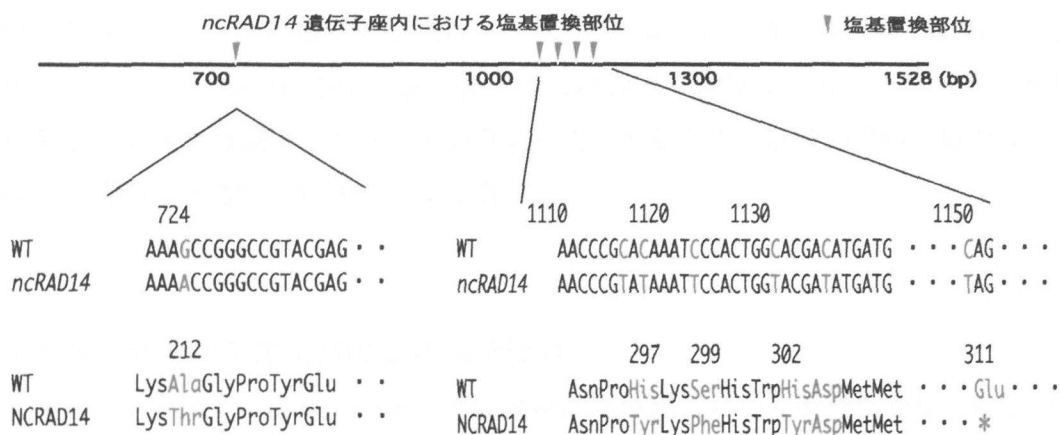


Fig. 3-2. *ncRAD14* 遺伝子破壊株の塩基配列の決定

ncRAD14 遺伝子破壊株と野生株の塩基配列を比較した。GからA、CからTへの塩基の置換は、RIPにより起こる突然変異の傾向である。これらの塩基の置換により、212番目のアミノ酸がAlaからThrへ移行されたのを始め、311番目のGluが終止コドンになることが予測された。

サザンハイブリダイゼーションとスポットテストによって形質転換時に導入したハイグロマイシン B 耐性遺伝子、および *ncRAD14* 遺伝子断片が紫外線感受性株 (MS-1-14) に残存しているかを確認した結果、MS-1-14 株にはハイグロマイシン B 耐性遺伝子と *ncRAD14* 遺伝子の一部が残存していることが明らかとなった。そのため、野生株と戻し交雑を行った。得られた子孫株 43 株中 9 株が紫外線感受性株であり、その子孫株 MST-CT-1A 株では遺伝子重複株を作る際の形質転換マーカーとして用いたハイグロマイシン B 耐性遺伝子を含んでいないことを確認した。以後の実験では MST-CT-1A 株を *ncRAD14* 遺伝子破壊株として用いた。

3-3-3 *mus-43* 変異株の変異原感受性

スポットテストにより *ncRAD14* 変異株が紫外線に対して感受性を示したことから、他の変異原に対する感受性をスポットテストにより調べた。その結果、4NQO (4-nitroquinoline 1-oxide) に対して強い感受性を示したが、DNA のメチル化を誘発するアルキル化剤 MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)、MMS (methyl methanesulphonate) に対しては感受性を示さず、またトポイソメラーゼ I 阻害剤である CPT (camptothecine)、複製を停止させる HU (hydroxy urea)、DNA 二本鎖切断を誘発する BLM (bleomycin) に対しても顕著な感受性は確認されなかった。紫外線、4NQO 以外の変異原では顕著な感受性は確認されなかったことから、DNA 二重らせんに歪みを生じる損傷だけを修復する遺伝子に関与している事が示された (Fig. 3-3A)。また、この変異原感受性のパターンは、すでに解析が行われている NER 遺伝子である *mus-38* 遺伝子の変異株の感受性パターンと同じであった。*ncRAD14* 遺伝子変異株が、紫外線と 4NQO に対して感受性を示したので、アカパンカビの命名法に従って、*ncRAD14* 遺伝子を *mus-43* (MUtagen Sensitive) 遺伝子と改名した。

mus-43 変異株の紫外線に対する感受性を詳細に調べるため、生存曲線を作成した。コントロールとした野生株と比べ、*mus-43* 変異株の紫外線に対する感受性は $400\text{J}/\text{m}^2$ で約 0.3% であり、野生株 ($400\text{J}/\text{m}^2$: 2.25%) と顕著な差を確認したが、これまでに NER 変異株として同定されている *mus-38* 変異株よりも感受性が低かった (Fig. 3-3B)。しかしながら *mus-43* 変異株の感受性は既に同定されている出芽酵母 *Rad2* ホモログである *mus-40* 変異株と同じような感受性を示した。

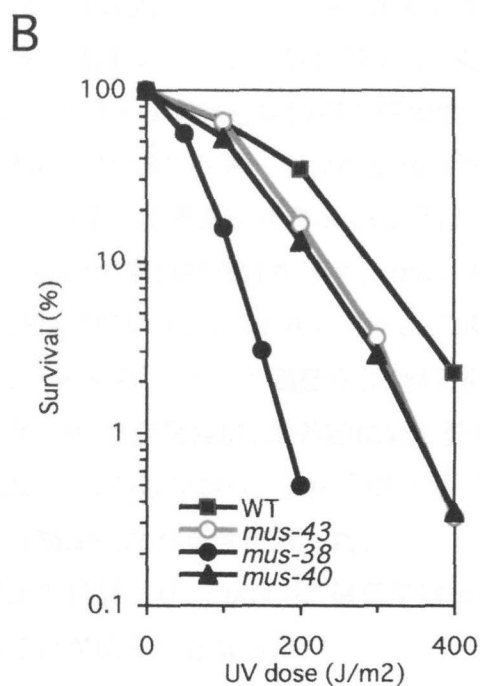
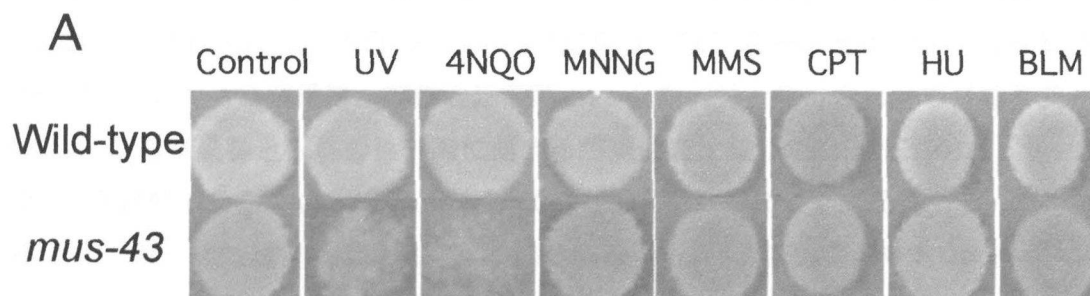


Fig. 3-3. *mus-43* 変異株の変異原に対する感受性と紫外線に対する生存率

(A) *mus-43* 変異株の変異原に対する感受性

mus-43 変異株は紫外線、4NQO に感受性がみられたが、その他の変異原には感受性を示さなかった。すでに解析されている NER 変異株 *mus-38* と同様な表現型であることが明らかになった。

(B) *mus-43* 変異株の紫外線に対する生存率

mus-43 変異株は野生株よりも顕著な感受性を示したが、これまで解析されていた *mus-38* 変異株よりも紫外線に対する感受性は低く、*mus-40* 変異株に近い感受性を示した。

3-3-4 *mus-43* におけるエピスタシス解析

mus-43 変異株が紫外線に対し感受性を示したが、どの修復系に属する遺伝子かをさらに詳細に調べるため、NER 系 *mus-38* 変異株、第二除去修復系 *mus-18* 変異株、組換え修復系 *mei-3* 変異株、複製後修復系 *Uvs-2* 変異株と掛け合わせで二重変異株を作成し、二重変異株と親株の紫外線に対する感受性を比較した (Fig. 3-4)。

NER 変異株である *mus-38* 変異株と *mus-43* 変異株との二重変異株 *mus-43 mus-38* では、紫外線に対する感受性は、親株である *mus-38* 変異株よりも *mus-43* 変異株の感受性に似た結果を示した (Fig. 3-4A)。しかしながら、*mus-43 mus-38* 二重変異株が親株と比較して、紫外線に対し、相加的・相乗的な感受性を示さなかったことから *mus-38* 遺伝子と *mus-43* 遺伝子は同じ修復系で作用していることが推測された。第二除去修復 *mus-18* 変異株は *mus-43* 変異株よりも紫外線に対する感受性は高く、NER *mus-38* 変異株と同程度の感受性である。*mus-43 mus18* 二重変異株では、それぞれの親株である単一変異株に比べ紫外線に対して相乗的な感受性の増加を示した (Fig. 3-4B)。複製後修復系 *Uvs-2* は *ultraviolet sensitive-2* の略称であり、紫外線に対し極めて高い感受性を示す。*mus-43* 変異株は *Uvs-2* 変異株よりも紫外線に対する感受性は低い、*mus-43 Uvs-2* 二重変異株は、*Uvs-2* 変異株の感受性よりも高くなり、*mus-43, Uvs-2* 遺伝子は他経路で働くことが推測された (Fig. 3-4C)。組換え修復系 *mei-3* 変異株は、紫外線に対し野生株と同様に、ほとんど感受性を示さない (Fig. 3-4D)。しかしながら、*mus-43 mei-3* 二重変異株は紫外線に対し、*mus-43* 変異株よりも相加的な感受性を示した。

以上の結果より、*mus-43* 遺伝子は *mus-38* 遺伝子と同じ NER 系に属する遺伝子であることが明らかとなった。

3-3-5 *mus-43* 変異株の復帰突然変異頻度の測定

mus-43 変異株の紫外線感受性が、*mus-38, mus-44* 変異株よりも低く、*mus-40* 変異株と同程度であることを確認した (Fig. 3-3B)。*mus-43* 変異株の紫外線に対する感受性の相違が突然変異の誘発に与える影響を、*pan-2* 遺伝子座の紫外線誘発復帰突然変異率で調べた。

復帰突然変異頻度の測定は、2 種類のパントテン酸要求株 (*pan-2* (B36), *pan-2* (OGW1)) を用いて行った。*pan-2* (B36) は塩基置換型変異を持つものに対して、*pan-2* (OGW1) はフレームシフト型の変異を持つっている (Ogawa, unpublished data)。こ

れら二つの株と *mus-43* 変異株と交配させて二重変異株を作製し、紫外線に対する復帰突然変異頻度を測定した。

mus-43 変異株の突然変異頻度は、塩基置換型、フレームシフト型の両テスターにおいて、野生株をバックグラウンドにもつ株の突然変異率よりも 2~3 倍程度高くなることが明らかになった (Fig. 3-4)。



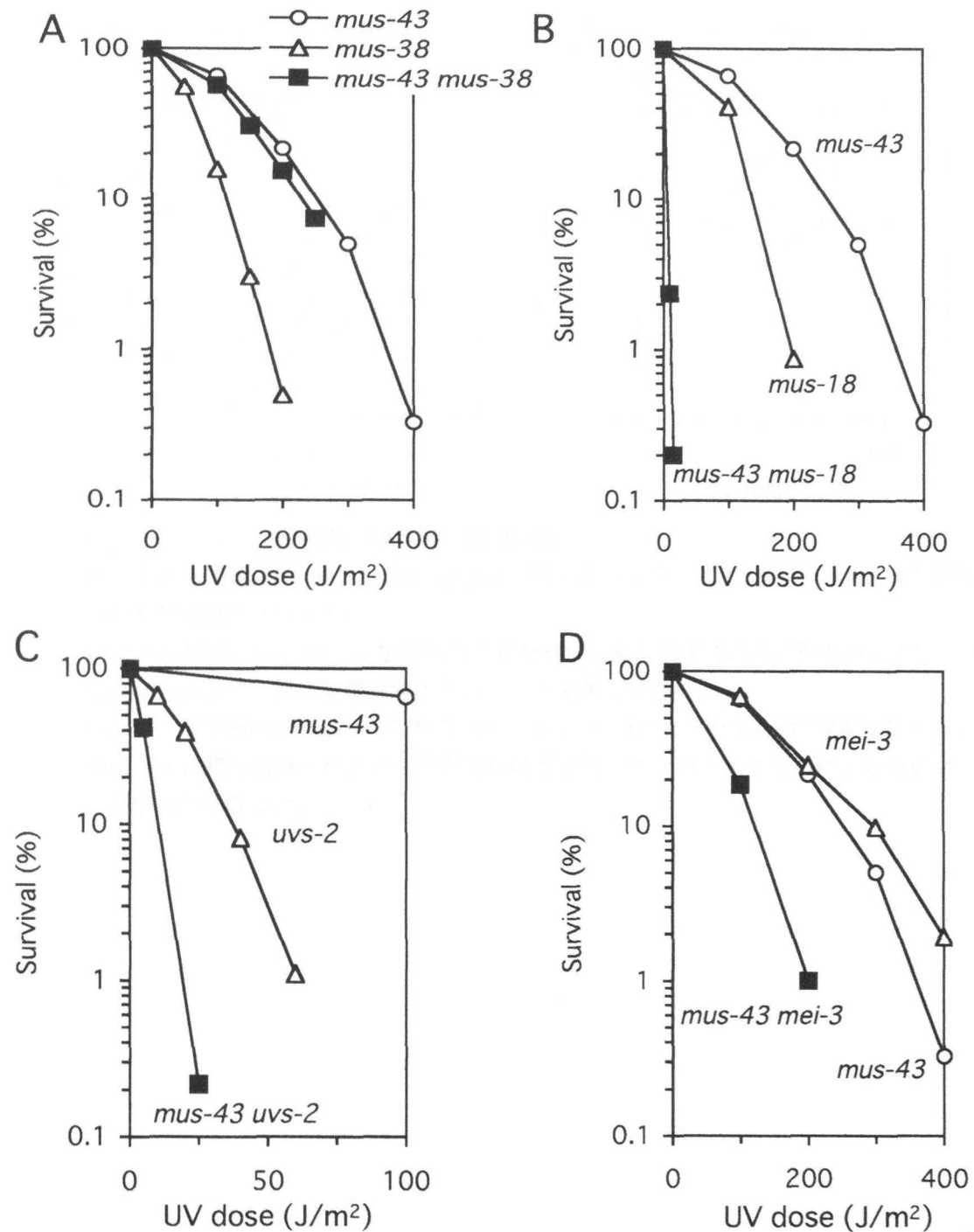


Fig. 3-4. *mus-43* 変異株のエピスタシス解析

(A)NER 系 *mus-38* 変異株、(B)第二除去修復系 *mus-18* 変異株、(C)組換え修復系 *mei-3* 変異株、(D)複製後修復系 *uvr-2* 変異株との二重変異株の紫外線に対する感受性をそれぞれ調べた。

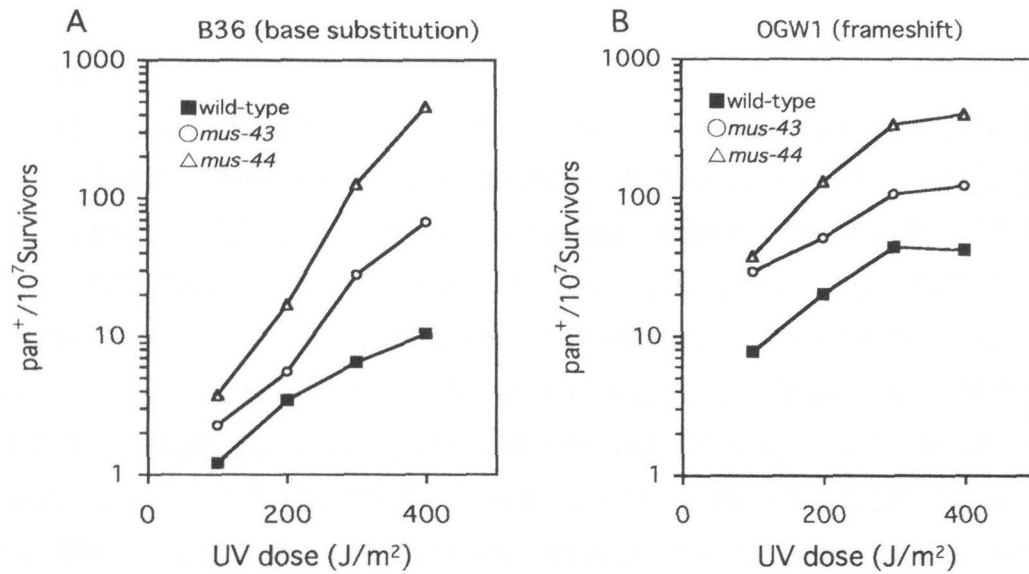


Fig. 3-5. *mus-43* 変異株の復帰突然変異頻度

パントテン酸要求株 *pan-2*(B36)と *pan-2*(OGW1)を用いて *mus-43*、*mus-44* 変異株の突然変異の誘発をみた。

(A)*pan-2*(B36)は *pan-2* 遺伝子内の塩基置換による変異株である。(B)*pan-2*(OGW1)はフレームシフト型の変異が導入されている変異株である。

mus-43 変異株と *mus-44* 変異株は共に野生株と比べて突然変異頻度が上昇した。*mus-43* 変異株は野生株よりも突然変異頻度は高いが、*mus-44* 変異株よりも低いことが明らかになった。

第4章 アカパンカビ *ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 遺伝子の解析

4-1 緒言

出芽酵母 Rad4、Rad23 タンパク質は、ヌクレオチド除去修復において複合体を形成し、損傷認識に関与していることが知られている[Reynolds et al., 1981]。また、ヒト、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) における RAD4 のホモログ遺伝子として XPC、*rhp4A* (*rhp41*)、*rhp4B* (*rhp42*) が単離されており、RAD23 のホモログ遺伝子として HR23A、HR23B、*rhp23* が単離されている[Bohr VA et al., 1986; Thomas et al., 2002]。XPC-HR23B、Rhp4A-Rhp23 は、Rad4-Rad23 同様に複合体を形成し、損傷認識に関与している[Orlando and Schärer, 2007]。Rad4、XPC、Rhp4A、Rhp4B は DNA 結合ドメインを持っており、DNA 損傷の認識において主要な役割を果たしていると考えられている[Uchida et al., 2002]。また、Rad23、HR23A、HR23B、*rhp23* は NER 因子としては唯一 UBL(ubiquitin like)、UBA(ubiquitin associated)ドメインを持っており、プロテアソームとの相互作用を介して、Rad4 タンパク質の安定性を調節していると考えられている[Wood et al., 2000]。Rad4、XPC、Rhp4A、Rhp4B は DNA に結合する際、正常な DNA と損傷した DNA のどちらにも結合する。この Rad23、HR23A、HR23B、*rhp23* とプロテアソームの相互作用は、このような正常な DNA への悪影響を避けるためにある機構であると考えられる[Wood et al., 2000]。

酵母と同じ下等真核生物であるアカパンカビ (*Neurospora crassa*) においても、変異原感受性を示す変異体の解析から、これまでにいくつかの NER に関与する遺伝子が単離されてきた。出芽酵母 RAD1 のホモログ遺伝子である *mus-38* [Hatakeyama et al., 1998] や RAD2 のホモログ遺伝子である *mus-40* が NER に関わる遺伝子として、これまでに単離されている。しかし、アカパンカビにおける NER 機構には未だ単離されていない遺伝子が多く、NER 機構はまだ不明な点が多い。

本章では、アカパンカビにおけるヌクレオチド除去修復機構の解析を目指し、出芽酵母の RAD4、RAD23 のホモログ遺伝子であるアカパンカビ *ncRAD4A*、*ncRAD4B*、*ncRAD23* 遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。

4-2 材料と方法

[使用菌株とベクター]

本実験で使用したアカパンカビの株とその遺伝子型を Table 4-1 に示した。アカパンカビ野生株として、C1-T10-37A と C1-T10-28a をそれぞれ使用した[Tamaru and Inoue, 1989]。 *mus-38* 変異株 (CZ-272-16A, CZ-272-5a)、 *mus-18* 変異株 (C2-T40-9A)、 *mei-3* 変異株 (FGSC2764A)、 *Uvs-2* 変異株 (74-OR244-3A) は、埼玉大学遺伝学研究室より頂いた。プラスミド構築に使用した大腸菌の株とその遺伝子型を Table 4-2 に示した。PCR 増幅 DNA 断片のクローニングには pT7Blue® (Novagen)を使用し、アカパンカビの形質転換には pCB1003 と pBARMTE1 をベクターとして用いた。pCB1003 プラスミドには、アカパンカビ細胞内で機能する選択マーカーとしてハイグロマイシン B 耐性遺伝子(*hygB^r*)が挿入されており、pBARMTE1 プラスミドには、アカパンカビ細胞内で機能する選択マーカーとしてピアラホス耐性遺伝子が挿入されている。アカパンカビゲノムライブラリー (pMOcosX) [Orbach and Sachs, 1991]は、FGSC(Fungal Genetics Stock Center)より入手した。

Table 4-1. Strains of *N.crassa* used in this study

Strain number	Genotype	Source/reference
C1-T10-37A	<i>A</i>	Tamaru and Inoue (1989)
C1-T10-28a	<i>a</i>	Tamaru and Inoue (1989)
FGSC4105A	<i>A pan-2</i> (B36)	FGSC
C2-S2-8a	<i>a pan-2</i> (OGW1)	Kawabata et al.(2008)
CZ-272-16A	<i>A mus-38</i>	Ishii et al.(1998)
CZ-272-5a	<i>a mus-38</i>	Ishii et al.(1998)
C2-T40-9A	<i>A al-2 pan-2 cot-1 mus-18A</i>	Ishii et al.(1991)
74-OR244-3A	<i>A al-2 pan-2 cot-1 uvs-2</i>	De Serres et al. (1980)
FGSC2764A	<i>A mei-3</i>	FGSC
MA-H-4A	<i>A ncRAD4A</i>	This study
C2-MA-4A	<i>mus-18 ncRAD4A</i>	This study
CZ-HO-4B	<i>mus-38 ncRAD4B</i>	This study
T2-HO-4B	<i>mei3 ncRAD4B</i>	This study
OR-HO-4B	<i>uvs-2 ncRAD4B</i>	This study
I-To-23	<i>ncRAD23 matA</i>	This study
C2-EMI-23	<i>mus-18 ncRAD23</i>	This study
CZ-SA-23	<i>mus-38 ncRAD23</i>	This study
T2-YU-23	<i>mei-3 ncRAD23</i>	This study
OR-RI-23	<i>uvs-2 ncRAD23</i>	This study
MA-HO-8	<i>ncRAD4A ncRAD4B</i>	This study
HO-EM-31	<i>ncRAD4A ncRAD23</i>	This study
MA-EM-31	<i>ncRAD4B ncRAD23</i>	This study
MA-HO-EM-31	<i>ncRAD4A ncRAD4B ncRAD23</i>	This study
MA-HO-C2-8	<i>ncRAD4A ncRAD4B mus-18</i>	This study
MA-EM-C2-27	<i>ncRAD4A ncRAD23 mus-18</i>	This study
HO-EM-C2-27	<i>ncRAD4B ncRAD23 mus-18</i>	This study
MA-HO-EM-C231	<i>ncRAD4A ncRAD4B ncRAD23 mus-18</i>	This study

FGSC, Fungal Genetic Stock Center

Table 4-2. Strains of *E. coli* used in this study

Strain number	Genotype
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), e14- (mcrA-), supE44, relA1, Δ (lac-proAB)/F' [traD36, proAB+, lac lq, lacZ Δ M15]</i>
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F-, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1</i>

[培養]

アカパンカビの培養には、VM 培地（1×Vogel 最少培地，1.2 %（w/v） ショ糖）を使用し、寒天培地には 1.2 %（w/v） 寒天を加えた[Vogel, 1964]。ハイグロマイシン B とピアラホス耐性の形質転換体の選抜には、最終濃度 0.5mg/ml のハイグロマイシン B とピアラホスを培地に加えて行った。アカパンカビの分生子形成は、グリセロール完全培地（1×Vogel 最少培地，1 %（v/v） グリセロール，0.25 %（w/v） yeast extract，0.1 %（w/v） カザミノ酸，0.5 %（w/v） malt extract，1 %（v/v） ビタミンストック溶液，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて、1 週間培養することで行った。アカパンカビの交配は、SC 培地（1×Westergaards'合成培地，1.2%（w/v） ショ糖，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて行った。アカパンカビのコロニー形成には、コロニー形成培地（1×Vogel 最少培地，0.2 %（w/v） ショ糖，1 %（w/v） ソルボース，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて行った。基本培地の成分は、Table 4-3 にまとめた。

大腸菌の培養には、LB 培地（1 %（w/v） バクトトリプトン，0.5 %（w/v） 酵母エキス，1 %（w/v） 塩化ナトリウム）を使用し、寒天培地には 1.2 %（w/v） 寒天を加えた。アンピシリン耐性の選抜には、アンピシリンを最終濃度 50 μ g/ml になるように加えて行った。

Table 4-3. Mediums used in this study

50×Vogel's 最少培地(1000ml 中)		
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		125g
KH_2PO_4		250g
KH_4NO_3		100g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		10g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		5g
ビオチン水溶液		25ml
Vogel's 微量元素液		5ml
Vogel's 微量元素液(100ml 中)		
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		5g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		5g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		1g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.25g
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		0.05g
H_3BO_3		0.05g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.05g
ビオチン水溶液 (1000ml 中)		
Biotin		40mg
ビタミンストック溶液 (100ml 中)		
サイアミン (ビタミン B1)		10mg
リボフラビン (ビタミン B2)		5mg
ピリドキシン (ビタミン B6)		5mg
パントテン酸カルシウム		50mg
パラアミノ安息香酸		5mg
ニコチン酸アミド		5mg
塩酸コリン		100mg
葉酸		1mg
イノシトール		100mg
10×Westergaards' 合成培地(1000ml 中)		
KNO_3		10g
KH_2PO_4		10g
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		5g
NaCl		1g
CaCl_2		1.3g
Vogel's 微量元素液		10ml
ビオチン水溶液		10ml

[基本的な遺伝子工学的手法]

プラスミド DNA の少量調整などの基本的な遺伝子工学的手法は、Sambrook らによる方法 [Sambrook et al., 1989]に従った。大腸菌の形質転換は、Perbal の実験書 [Perbal, 1988]に従った。コンピテント細胞作製には、JM109 株、DH5 α 株を使用した。精製した DNA の確認はアガロース電気泳動により行なった。

[サザンハイブリダイゼーション]

アガロースゲルからメンブレンへ DNA を移行するために、キャピラリートランスファーまたは VacuGene™ blotting system (Pharmacia)を使用した。メンブレンは、Hybond-N⁺(Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。DIG によるプローブの標識法として、ランダムプライム法を用いた。ランダムプライム法には、DIG ハイプライム(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を使用した。メンブレンとプレハイブリダイゼーション溶液を耐熱性のタッパーに入れ、68℃で 2~3 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、熱変性させた標識プローブをタッパーに加え、15 時間以上 68℃で保温した。

ハイブリダイゼーション後の検出は、基質として NBT(ニトロブルーテトラゾリウムクロライド)と BCIP (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸)を用いた発色反応により行なった。まず、メンブレンを室温で No.1 洗浄液(2×SSC、0.1% SDS)で 5 分間、2 回洗浄し、次に 68℃で No.2 洗浄液(0.1×SSC、0.1% SDS)で 15 分間、2 回洗浄した後、Wash Buffer[0.3% Tween-20® in Buffer1(0.1M マレイン酸、0.15M NaCl ; pH7.5)]で 1 分間洗浄した。その後、Blocking Buffer (1% Blocking stock solution in Buffer1)で 30 分間インキュベーションした後、20ml の希釈抗体溶液(150mU AP 標識抗ジゴキシゲニン抗体、Fab フラグメント/ml Buffer)で 30 分間インキュベーションした。次に、Wash Buffer で 15 分間、2 回洗浄した後、メンブレンを検出 Buffer(100mM Tris-HCl、100mM NaCl、50mM MgCl₂ ; pH9.5)で 2 分間平衡化した。そして、暗冷下で、10ml の発色溶液(200 μ l NBT/BCIP 溶液/10ml 検出 Buffer)と共にメンブレンをインキュベーションし、発色反応させて検出した。

[PCR]

PCR 法による DNA の増幅には、鋳型 DNA により 3 種類の酵素を使い分けた。使用した酵素は、Taq Polymerase、KOD DNA Polymerase (TOYOBO)、LA Taq Polymerase (TAKARA)を使用した。また、それぞれの酵素に用いた反応条件は、以下の通りで

ある。

(Taq Polymerase)

0.2ml のマイクロチューブに、鋳型 DNA (0.05 μ g)、プライマー (0.5 μ M)、10 \times 緩衝液[100mM Tris-HCl, 500mM KCl(20℃で pH8.3)]を 5 μ l、dNTP 混合液(dATP、dCTP、dGTP、dTTP が各 2.0mM) を 5 μ l、25mM 塩化マグネシウム溶液を 3 μ l、Taq Polymerase を 1 μ l 入れて、純水 (D.W.) で全量 50 μ l になるように調整した。

(KOD DNA Polymerase)

0.2ml のマイクロチューブに、鋳型 DNA (0.05 μ g)、プライマー (0.5 μ M)、10 \times 緩衝液[50mM Tris-HCl(pH8.0)、0.1mM EDTA、1mM DTT、0.001% Tween-20、0.001% Nonidet P-40、50% Glycerol] を 5 μ l、dNTP 混合液 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP が各 2.0mM) を 5 μ l、25mM 硫酸マグネシウム溶液を 2 μ l、KOD-plus-を 1 μ l 入れて、純水 (D.W.) で全量 50 μ l になるように調整した。

(LA Taq Polymerase)

0.2ml のマイクロチューブに、鋳型 DNA (0.05 μ g)、プライマー (0.2 μ M)、2 \times GC 緩衝液 (5mM のマグネシウムを含む) を 25 μ l、dNTP 混合液 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP が各 2.0mM) を 6 μ l、LA Taq を 1 μ l 入れて、純水 (D.W.) で全量 50 μ l になるように調整した。

また全てのプライマーの合成と精製は、日本バイオサービス社に依頼した。プライマーの塩基配列と名前を Table. 4-4 に示す。

[アカパンカビからのゲノム DNA の調整]

アカパンカビからのゲノム DNA の調整は、Irelan らの方法[Irelan et al., 1993]を改変して行った。30ml の VM 液体培地に少量の菌糸を加え、30℃で 2 日間振とう培養した後、培養液を濾過して菌糸を集めた。この菌糸を液体窒素で瞬間冷凍して、ゲノム DNA の調整に用いた。適量の菌糸に Isolation Buffer(50mM Tris-HCl[pH8.0]、170mM EDTA[pH8.0]、1% N-louroylsarcosin)を 500 μ l、ガラスビーズを加え、ビーズビダーで細胞を粉砕した。7.5M 酢酸アンモニウム、フェノール、PCI(フェノール:クロロホルム:イソアルミアルコール=25:24:1)を加え、除蛋白を行った後、イソプロパノール沈殿を行い、ゲノム DNA を抽出した。これに RNaseI を加え、RNA を

分解後、PEG (1.6M NaCl、13% polyethylene glycol) 沈殿を行い、ゲノム DNA 溶液とした。

DNA は吸光度計を用いて定量後、PCR、サザンハイブリダイゼーションなどに用いた。

Table 4-4. 本実験に使用したプライマーの名前と塩基配列

RAD4A1	5' -AAT TCG GTA CGG AGG TGC TAA t-3'
RAD4A2M	5' -GTC GTG ACT GGA AAA CCA GTT TTG TGT GTT GGG GGA C-3'
RAD4A3M	5' -GTC ATA GCT GTT TCC TGG TGT TGA TAG CGT TTT GCA GGG-3'
RAD4A4	5' -AAG TGT TCC CAG CGT TAT AGG C-3'
XPC1	5' -CTC ATC ATC CTC ATC TAC CAC-3'
XPC2	5' -GAT TCA AAG GTC TAA CTC GGA-3'
XPC2-M	5' -GTC GTG ACT GGG AAA ACG ATT CAA AGG TCT AAC TCG GA-3'
XPC3-M	5' -GTC ATA GCT GTT TCC TGC TTT TTA GGG GTC GGT TTG AGA-3'
XPC4	5' -GAC ATA GAG GCG TTG GAT GTA G-3'
HR23B1	5' -TTC TTC CTC GTT CTC TTT GGC-3'
HR23B2-M	5' -GTC GTG ACT GGG AAA ACT AAA GTC AGT ATT CGG GAG CGG-3'
HR23B3-M	5' -GTC ATA GCT GTT TCC TGA CAA GGT ACT ATT TCC CCC GT-3'
Rad23K	5' -CCC CTA TTT ATT GTT GGG GCA-3'
M13-M4	5' -GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'
M13-R	5' -CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
HY	5' -GGA TGC CTC CGC TCG AAG TA-3'
YG	5' -CGT TGC AAG ACC TGC CTG AA-3'
BAR-F	5' -TAA AAG TCA ACC CCC TGC G-3'
BAR-R	5' -CCT TCC TGT TTT TGC TCA CC-3'
XPC-F	5' -GTG GTT AAG TGA TAG AAG CAA GTG GG-3'
XPC-R	5' -TCT TCC ACC CAA TCC TGC CTT-3'
Rad4A-F	5' -TTA GCG ACG AAA CGC TTG CCT TGG-3'
Rad4A-R	5' -GGC CGC TGT AGC CGC GCG ATT-3'

[アカパンカビの遺伝学的解析]

アカパンカビの交雑など遺伝学的解析は Davis と de Serres の方法 [Davis and de Serres, 1970] に従って行なった。

[アカパンカビの変異原感受性]

変異原処理したアカパンカビの生存率の測定は、Inoue と Ishii の方法 [Inoue and Ishii, 1984] に従った。

アカパンカビ分生子を $1/15\text{M}$ リン酸緩衝液[pH7.0]に懸濁し、 1×10^6 個/ml の懸濁液とした。これを 9cm シャーレに 20ml ずつ加え、そこに紫外線を照射した。紫外線は $2.5\text{J}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ の強度で照射した。照射後、 $100\mu\text{l}$ 採取し希釈した後、1000 個をコロニー形成用寒天培地に混ぜて 15cm シャーレにひろげ、 30°C で 3 日間培養して現れたコロニーを数え、これをもとに生存率を求めた。

[スポットテスト]

アカパンカビの変異原に対する感受性を調べるために、スポットテストを行った。培地として、コロニー形成培地を用いた。

4NQO(4-nitroquinoline-1-oxide)、MMS(methylmethane sulfonate)はオートクレーブ滅菌後の培地が 60°C 以下になった後に加え、一様にシャーレに広げた。感受性を調べる株の分生子を滅菌水に懸濁し、この懸濁液を寒天培地上にパスツールピペットを用いてスポットした後、 28°C で 2 日間培養し、菌糸の増殖を調べた。

紫外線に対する感受性は、変異原を添加していない上述のプレート上に分生子の懸濁液をスポットした後、 $50 \sim 400\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線を照射し、暗条件下で 28°C 、2 日間培養し、菌糸の増殖を調べた。

[遺伝子の破壊株の作成]

遺伝子の破壊株は、fusion PCR 法を用いて破壊用断片を作成したあと、その断片をエレクトロポレーションを用いてアカパンカビに形質転換し、相同組換えを起こさせ作成した。fusion PCR 法は、まずプライマー A と B で遺伝子の 5' 側を、C と D で 3' 側を、E と F で選択マーカーとしてハイグロマイシン B 耐性遺伝子やピアラホス耐性遺伝子などの選択マーカーを PCR 法により増幅した。このときプライマー B と E、C と F がそれぞれ相補的になるようにハイブリッドに設計しておいた。続いて先ほど PCR 法で増幅した 3 つの断片を混合し、プライマー A と D を用いて PCR 法を行うと、ハイブリッドに形成した部位がプライマーとなり選択マーカーを含む遺伝子破壊用断片を

作成した (Fig. 4-1)。遺伝子が破壊できたかの確認は、PCR、サザンハイブリダイゼーションにより確認し、さらに必要があれば塩基配列を決定することにより確認した。

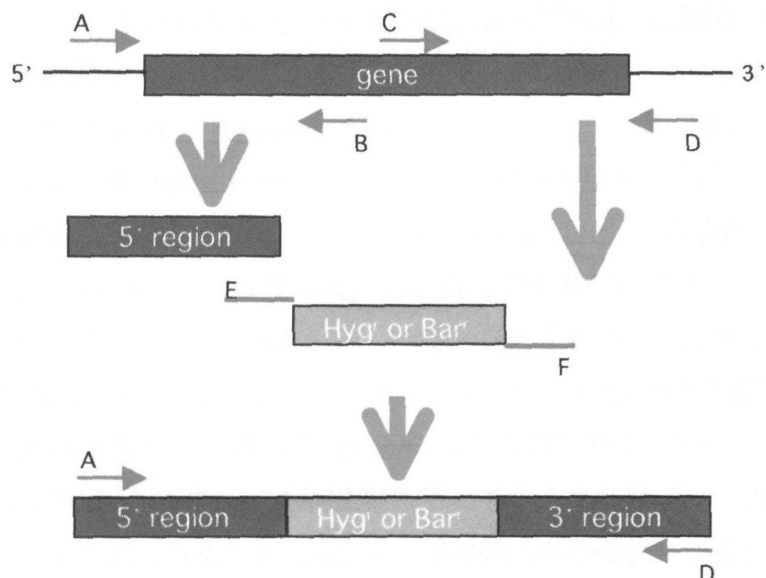


Fig. 4-1. Fusion PCR の概略

4-3 結果と考察

4-3-1 アカパンカビ *ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 遺伝子の検索

出芽酵母 *RAD4* 遺伝子のホモログをアカパンカビのゲノムプロジェクトデータベース Whitehead Institute for Biomedical Research (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>) を利用して検索を行った結果、出芽酵母 *Rad4* に相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子が 2 種類 (NCU04821.3, NCU06585.3) が存在した。分裂酵母でも *RAD4* ホモログ遺伝子として、*rhp4A* (*rhp41*) と *rhp4B* (*rhp42*) の種類の遺伝子が保存されている報告がある [Thomas, 2003; Fukumoto et al., 2002]。そこで、分裂酵母の 2 種類の遺伝子との相同性から、アカパンカビの 2 種類の遺伝子のうち NCU04821.3 を *ncRAD4A* 遺伝子、NCU06585.3 を *ncRAD4B* 遺伝子とそれぞれ名付けた。出芽酵母 *RAD23* 遺伝子に関しても同様に検索した結果、一つのホモログ遺伝子 (NCU07542.3) を見つけ、*ncRAD23* と名付けた。

ncRAD4A 遺伝子 (NCU04821.3) は、全長 3270bp で、5 つのエキソンからなる遺伝子であった。塩基配列から予想される *ncRAD4A* タンパク質は 1090 アミノ酸残基で、そこから予想される分子量は 121.5kDa であった。ゲノムデータベースのデータより、*ncRAD4A* 遺伝子は第 VI 連鎖群左腕に存在し、その近傍には *mus-29* と *mus-39* の 2 種類の修復遺伝子の報告があるが、両遺伝子変異株とは *ncRAD4A* 破壊株の表現型が多少異なることから、*ncRAD4A* 遺伝子は新規の遺伝子である可能性が高い [Perkins et al., 2001]。

ncRAD4B 遺伝子 (NCU06585.3) は、全長 3123bp の遺伝子でイントロンを含まず、塩基配列から予想される *ncRAD4B* タンパク質は 1041 アミノ酸残基であり、その配列から予想される分子量は 116.5kDa であった。ゲノムデータベースのデータから、*ncRAD4B* 遺伝子は第 IV 連鎖群の動原体近傍に存在した。この付近には、*mus-26* 遺伝子が存在するが、その表現型は *ncRAD4B* 破壊株とは異なることから、*ncRAD4B* 遺伝子は新規の遺伝子であると考えた [Perkins et al., 2001]。出芽酵母の *RAD4* 遺伝子は一つしか存在しないが、分裂酵母の *Rad4* ホモログ遺伝子は *rhp4A* と *rhp4B* 遺伝子の二つの存在が確認されている [Fukumoto et al., 2002]。

出芽酵母 *Rad4* とヒトの *Rad4* ホモログ XPC、分裂酵母 *Rhp4A*、*Rhp4B* のアミノ酸配列のアライメントを行った結果、*ncRAD4A* は出芽酵母 *RAD4* に対して 28.6% の Identities を示し、46.8% の Similarity を示した。ヒト XPC に対しては 25.8% の Identities と 43.5% の Similarity、分裂酵母 *Rhp4A* に対しては 30.5% の Identities

と 47.5%の Similarity、分裂酵母 rhp4B に対しては 30.3%の Identities と 51.4%の Similarity を示した (Fig. 4-2A、Fig. 4-2B)。一方、NCRAD4B は、出芽酵母 RAD4 に対して 26.3%の Identities と 44.6%の Similarity、ヒト XPC に対して 29.3%の Identities と 40.6%の Similarity、分裂酵母 rhp4A に対して 24.2%の Identities と 42.5%の Similarity、分裂酵母 rhp4B に対して 37.7%Identities と 49.1%の Similarity であることが明らかになった。

Fig. 4-2A、NCRAD4A-分裂酵母 rhp4A のアライメント

左列は NCRAD4A (ヒト)、右列は分裂酵母、rhp4A は分裂酵母のヒト/分裂酵母、rhp4B はヒト RAD4A は、出芽酵母のヒト/分裂酵母、分裂酵母 rhp4A と rhp4B のアライメントである。


```

Rad4      1: MNEDLPKEYFELIRKALNEKEAEKAPLSRRRRVRRKNQPLPDACK-KFKTGLNELPRESV
NCRAD4A   1: MAGRRKRPAGASTTTSTPRTRASTASRRASARSAPVDVYREMVSEARRMAVAEDVPEV
Rhp4A     1: MMSLEDNTYSDDDEWLDLDLGLPNNDIKTAPILNSSLLSSA--VHGE-RLIQ--ERPTH-

Rad4      60: VTVNLDSDDGVVTVPTDDSVVEIOSSEEDYD--SE-----EFEDVTDGNEVA
NCRAD4A   61: TTPERPLKRRRPGERQTLKV-ETKPVKPTVIPEPTKTHHDDPEDDDDELEFEDVELPPP
Rhp4A     55: -----DFGDV-----EAT-VDRT--

Rad4      106: GVEDISV-----E-----I----KPSSKRNSDARRTSR---
NCRAD4A   120: TLQTIITRDSDDDEDELEVEDIAFDSQGAFFSSAVAGDVQLDLNLSAQKAAMAPHRRVVER
Rhp4A     67: ----VEKRS---R--LKITSVDRKIR--LQ-----

Rad4      130: NVCSNE-ERKRRKYFHMLYLCLMVHGFIRNEWINSKRLSRKLSNLVEEKVFEELHPQKD
NCRAD4A   180: RKALSKSEKEQPRETHKIHLLCLLAHVERNNRWCNPNKVQEAALPLLTDMKRSILPRAS
Rhp4A     86: -----IHOHLHLLCLTYHLCTRNTWCDDNRLNYLVKYIPEGI-EVSLHPSQ

Rad4      189: EELPLRSTRKLLDGLKKCMELWQHKWKITKKYDNEGLYMRTWKEIEMSANNKRKFK-TLK
NCRAD4A   240: LNCYGRTESLKAG-LOETSTMETKTKFOITERGLRRALWAEDEEQ--LKNYQLPDDLETVK
Rhp4A     131: KSCMIRNKTFLHG-LAGLVEVWKRKYKITTNGLRKPNYGLLQNNLSISESLSLE-----

Rad4      248: RSDFLRAVSKGHGDP-DISVQGFVAMLRACNVNARLIMSQPPDETNNMKIDTSLNGNNAY
NCRAD4A   297: SKGDFLOAAKCLSGSRDVGALFCALLRSIGVQARLVCSLOPLSCVP-GAPTMPKQPKTK
Rhp4A     184: ---EFCKNSKLLSGSRDVGTLFASILRNINLVPTRLVFSLOVLSFRFKGATNEASSH--E

Rad4      307: KDMVKYPIFWCEVWDKFSKKWITVDPVNLKTIEQVRLHSLAPKGVACCE--NMLRYVI
NCRAD4A   356: SLNASKGPSAADRYAAAMSKYDNTVATPDPTPAFLSGRRLGHPNATAYNVPSMTAPPP
Rhp4A     239: IVPAWSQOMENDSSSD-ISESAHITS---R--FRKRRKII-QSFSNLSH--LDASDI

Rad4      365: AYDRKYGCRD--VTRR--YAC-WMNSKVRKRRTKDDFGEKWFRKVITALHHRKRTKIDD
NCRAD4A   416: PPSRPEIPKARTIKGESPYFIYWVEVLDEAQCKWHP-VDPLVTNTQWRP-PALEPPASDK
Rhp4A     288: VTEDTKL---KVIDSPK--PVFWVEAFNKAMQKWC-VDPFGDASVIGKYRREFEPASSDH

Rad4      420: YEDQYFFORDESEGI PDSVQDLKNHPYYVLEQDIKOTQIVKPGCKECCGYLKVHGKVGKVL
NCRAD4A   474: ENSLYTAIAFDDEGFAOVTRRYAKAYNSKTKRQRIDGPISPTTSGINTGERWLR-RLF
Rhp4A     342: LNCMTYVFATEANGYVKDVTRKYCLHYIKILKN-RVEIF--EFKA-----NMN-RIF

Rad4      480: KVYAKR-DIADLKSAOWY-MNGRILKTGS-----RCKKVIKRTVGRPKGEAEEDERL
NCRAD4A   533: LRHYTATDFPTLDQIELNELA-ALEGAEPMRNVDKDHPTIYALERHILRNVEVFLPGA
Rhp4A     391: SKIGKPRDFYNDMAIEDAELL-RLEQSEGI PRNIODLKDHLFVLERHLKKNQAIKTGK

Rad4      532: YSFEDTELYIP-PLASASGEITKNTFGNIEVFAPTMI---GNCLLENFVAIKAAARFLG
NCRAD4A   592: QSTGTVSAGSKAPVERIYRKQDVVARSRKKWFRLLGRVVKPGEFPVKVLEPKRRKSSKFG
Rhp4A     450: SC-GRINTKNG--VELVYPRKYVNSNGFSAEHWYRKGRI IKPGAQPLKHVKNGDKVLPLYD

Rad4      588: VEFAPAVTSFKFERGSTVKPV-LSGIV-VAKWLREAETAIDGIE-FIQEDDNRKEHLLG
NCRAD4A   652: GEMISSTSPS-LETDNEDDEGDLFGDYSLAKAGGTPLYTPQOT-ELYVPPPVSKSGKI PR
Rhp4A     507: EEAT-----Q-----LYTP---KPVVANI-----VPR

Rad4      645: ALESWNTLLK-LRIRSK-----LNSTYGRIAEEEPNVTKEQNIADNHDN
NCRAD4A   710: NKEFGNVEVYVPSMVPAGGAHI PHERAAQA-AHILGVVDYAPALTGFIEWKGRKGTARILGVV
Rhp4A     526: NAYGNIDLYVPSMLPYGAYHCRK-RCALAAAKFLEIDYAKAVVGDFORKYSKPKLEGVV

Rad4      689: T-----ETFMGGGFLPGIANHEA---RPYSEPSEPEDSLDYVSVDKAEESATDDDVGEDY
NCRAD4A   769: VPEQAAEA VRAVITGLVDMMEEREERRRRMEVGGGGGGGGIREHV-KMTR-KGKRKKREK
Rhp4A     585: VSKRYEEAIDLIAEEI-QEEKEAEARNVRK---TCLL-LWKRLITGL-RIRQ-----R

Rad4      741: SDFMKELE---MSEESD-----
NCRAD4A   827: RRRRSSLIGRWCMRRVMERRSFIWIWIMMMKKGVVGS
Rhp4A     633: V-----FEE-YG-----

```

Fig. 4-2A. NCRAD4A アミノ酸配列のアライメント

赤枠内は相同なアミノ酸を表す。Rad4 は出芽酵母、Rhp4A は分裂酵母のアミノ酸配列。アカパンカビ NCRAD4A は、出芽酵母 Rad4 と 28%、分裂酵母 Rhp4A と 30%の相同性であった。

```

RAD4      1: MNEELPKEYFELIRKALNEKEAEKAPLSRRRRVRKRNQPLPDAKKFKFTGLNELPRESVV
ncRAD4 B  1: MPPYVPRKRVDESPPPANDLKNDAKRRKGKENLNAAKLSAPPRKPTLFDALDATASPAS
rhp4B     1: MPPKR--KASKNSVRGRKRRTRTNNLPLNPEVKEETVVSSTH-RQTR-SQSKKPSLSSEA

RAD4      61: TVNLDSDD-----DGVVTVF-TDSDVEEIQSSEEDYDSEFE---DVTGDNEVAGVE
ncRAD4 B  61: SSKT-SLAALALDESSDDSSSLSSLSGDGFEDVPVLKKQKHNVQVGEDEDEDDDELEF
rhp4B     57: EPPSES---LDDNIS-----ALNSLORSASSSEKGSDENEKLGSSDD-----EFDD

RAD4      109: DISVEIKPSSKRNSDARRTSRNVCNEEPKRRKYFHL-----
ncRAD4 B  120: EDVEPYQPOSTTANVPEVPAG-DLELTLPDTRISLANALGKKGPSK-LERRIRVSTHCV
rhp4B     102: DFDTWEQVDLSFNKQEDKKD--LHIVTQHITPQ-LTKES-KKGSSSAMDKSIRLSITHIM

RAD4      147: YLVCLMVHGFIRNEWINSKRLSRK-LSNLMPEKVFELLHPQK-DEELPLRSTRKLLDGLK
ncRAD4 B  178: HVQLLWHNAVRNANWLCDEVC-GILLSHLPEKLWDEVDRWRNSGLEVVVPDGGGTAS
rhp4B     157: HFTCLLYHGSVRNFWLMSLLLDG-LRDLLEKOPSVVEAM-----VCSSQTHS--

RAD4      205: -----KCMELWQK-----H-----WKITKY-DNEG-LYMR-T-----
ncRAD4 B  237: TKKKSPAQKKTRAQVKGAQAKGKDAADRSRDWGAAPHLEK-CAVDMSHGDPLFRIM
rhp4B     205: -----DL-----LKLIL

RAD4      230: -----WKEIEMSANNKR--K--FKTLKRSDFLRAVSKGHGDPDI-----SV-----
ncRAD4 B  296: KVLSAWVKQRFRTTAPGLRKWGYMTLERLDRLTKAFNQEHPERFGERIASLEDFRECA
rhp4B     211: NGLRMWINKSEKIESHGLRKLGYRTLKQ-G-FDIGSPETIFHN--FHEYQASLLSLKGS-

RAD4      267: -----QGFVAMLRACNVNARLIMSOPEDFTNMKIDTSLNGNNAYKDMVKY---
ncRAD4 B  356: SECAGSRDVGACLFAMLRALGLEARIVASLOPLGFGWTVEEADPEKEEDLKPTPKKNM
rhp4B     266: -----RDLAOGFTALCRSLNLKARLIFSLOPLTFSTASYDWSPHILPEETSTS---

RAD4      313: -----
ncRAD4 B  416: GATSMAKETVTTHASGRSTRGASRKATKIORSNSELIAADSDDDLVIDHEPEPTPRMK
rhp4B     316: ---IDD-----D-----LRY-----PI-----

RAD4      315: -----F-----MCEVMDKFSKKWITVDPVNLKTIEQVRLHSLA--PKGVAACERNM
ncRAD4 B  476: NKVYDKDLEFPHYWTEVLSPVTKKYLFPVDPVKS I-IGTNRELIESLEPRGSKADKAKQV
rhp4B     325: -----F-----WTEIYDQSEKKWIAVDVAVVLNGVY-TND-MTW-FEPKGAYAESK-HL

RAD4      361: RYV-IA-YDRKYGCRDVTFRYAQWMNSKVRKRRTTKDDEGEKW-FRQVITALHHRKRTKI
ncRAD4 B  535: MAYVMGYSPDGTAKDVTVRYLKROTLPGRITKGMRI-PMEKVPVYNKHGKVARYEMYDWF
rhp4B     369: RMGIYAAYDNDLYAKDVTIRYTDYQSS--RLKKIRHVSE--ADK---Y-----FDF---Y

RAD4      418: DDYEDQYFFORDESEGIIDS-VQ-----DLKNH--PY---YVLEQ
ncRAD4 B  593: QTVMKGYARGGRSKPAMTDVLEENATDLKPAKPEKKEVKEGQETLQYYK-QSKEFVLER
rhp4B     414: KAIFGQLAKRNKDAEDIVE-----EKELESKVPIREPKSFA---D---F-KNHP-EFVLIR

RAD4      452: DIKQTIQVKGCKECCGYLKVKHVKV--KVLKVYAK-----RLIADLKSAQWYM
ncRAD4 B  652: HLKREEALLPNARPVKMFNRKSSSGSSSKKAATTTAATQDEPVYSRKDVVHVKSATWHK
rhp4B     462: HLKREEALLPNAKPVKTATFGN-GK--KATSEE-----V-YLRKDVIICKTPENYHK

RAD4      499: NGRILETGSRCKKVIK-RTVGRPKGEAEEDERL-----YSFEDTELYIPPLASAS
ncRAD4 B  712: QGRAPLPGEQPLKRVPYRAATNNRRREIAEAERLTGOKVLQGLYSFDQTDWIIPPIENG
rhp4B     510: EGRVIRKEGEQPRKMKARAVTISKRREHEFRVAETNEPVLOGLYSSDQTELYVPPPIKDG

RAD4      549: GEITKNTFGNIEVFAPTIMIFGNCCLVENPVAIKARFLGVEFAFVTSFKFERGSTVKPV
ncRAD4 B  772: -VIPKNEYGNIDLFAEHMCPGAVHYVYRGAMRVCKRLGIDYAEAVVDFEFGNRMAYP-V
rhp4B     570: -IIPKNGYGNMCEVESMIPKGAHLPYRGIAKIAKLNIDYADAVTGFEFRKHRAIP-V

RAD4      609: LSGIVVA-KWLREAI-ETAIDGTEFLQEDDNR-KEHLLGALESWNTLLKLRIKRSKLNST
ncRAD4 B  830: VQGVIIEAEHHDQ-VMEEVAK-DEAEKKRKEDEKRRKAALG-MWRKLLMGMRIVERIKQD
rhp4B     628: TTGIIVPEESAQM-VYEEFLE-CERTRIEKQOMKERKIIYG-QWKHLNALRIKRIIEEQ

RAD4      666: YGKIAEEEPNVTKEQNIADNHNT-ETF--MGG-----G--FLPG-IANHEA-RPYSEPS
ncRAD4 B  887: YGHVGDVEVFGRHGSGGADIRESDAEAEMGEDEETGGGGFLPEGFEVEDEERD-SHLR
rhp4B     685: YA-----

RAD4      714: EPEDSL-----DY-VSVDKAEESATDDVGEDYSDFMKEL-EMSEESD-----
ncRAD4 B  946: SSFFPVVDEDDDEDEDGDTLEVHCEGEGNGDQAEKKESAVMSTKPKRKAAAkakASIPG
rhp4B     687: -----

RAD4      755: -----
ncRAD4 B  1006: SRRRTRRNVPSSEDEDEDEDEDESELSDELEDDEEDF
rhp4B     687: -----

```

Fig. 4-2B. NCRAD4B アミノ酸配列のアライメント

赤枠内は相同なアミノ酸を表す。Rad4 は出芽酵母、Rhp4B は分裂酵母のアミノ酸配列。アカパンカビ NCRAD4B は、出芽酵母 Rad4 と 26%、分裂酵母 Rhp4A と 24%の相同性であった。

```

NCRAD23 1: NCRAD23 TFRDLKQOKFITLE-IEPTET-ISKVYOKISEERGWAPELOKLIYSGKILKD 57
scRad23 1: ----MVSLTFKNEFKKVPFLDLEPSNTILETNT--KLAQSSISCEESQIKLIYSGKVLQD 53
spRhp23 1: ----MNLTFKNLQOKFVISDVS-ADTKISELKEKIOTOQNYEVEKLIYSGRILAD 53

NCRAD23 58: EETVESYKIEFKG--FIVCVANKPKTTAPKPAESSSSAAAPATPAAAAPASTPAPPAAP 114
scRad23 54: SKTVSECGLKDGQOVVFMVSOKKSTKTKVTEPPIAPESATTPGRENSTEAS--PSTDASA 111
spRhp23 54: DKTVEYNIKEQD--FIVCVMSRKPTSTSTPKSAASPAPNPASVPEKKVEAPSSTVAE 110

NCRAD23 115: AASSAAAAAPSTPTPARTAAPEAAAPAGARDANALAMGEORAEIAMEAMGFERSQID 174
scRad23 112: APAATAPEGSQ-POEEQTATTERTESASTP---GFVVGT-ERNETIERIMEMGYOREEVE 166
spRhp23 111: STSTTQTVAAAAPSNPDITATSEAPID----ANTLAVGAORNVAENMVEMGYERSEVE 165

NCRAD23 175: AAMRAAFNNPERAVEYLLINGIPANLOOQTASROPSSAAPAAAPAAAAQAAAPAAAGDDDD 234
scRad23 167: RALRAAFNNPDRAVEYLLMGIPENLROPEPOQTAAAAEQPSTAATTAEQPAEDDLFAQA 226
spRhp23 166: RAMRAAFNNPDRAVEYLLTGIPEDILNRQ--REESAANLAAQQQSEALAPTSTGQPA-- 221

NCRAD23 235: QVNLFDLAAQLGNSAGGRGARG-AEGAGAEAAGLGNLDFLRNNA----Q-FQOMRQLVQE 288
scRad23 227: AOGGNASSGALGTTGGATDAAGGPPGSGILGT-VEDLLSLRQVVSNGNPEALRPLENISA 285
spRhp23 222: --NLFEQAA-ISENENQEQPSNTV--GDDP----LGFLRSIP---Q-FQOLROIIVQ 265

NCRAD23 289: Q-POMLEPILOQLGAGNPQLAQMIQNSDOFL----NLLGEGG--E--G-----GS 330
scRad23 286: RYPQLREHIMANPEVFVSMLEAVGDNMODVMGADDMV-EGEDIEVTGEAAAAGLGQGE 344
spRhp23 266: N-POMLETILOQLGQDPAQAQAITQMPAFL----QLLAEGA--E--GES--A-LPSGG 313

NCRAD23 331: V----QIAVTPEERDAIERLIRLGFPODQAIQAYFACDKDEELAANFLFDQGFEDDDMP 386
scRad23 345: GEGSFQVDYTPEDQAIISRLCELGFERDLVIOYFACDKNEEAAANILFS-----DHAD 398
spRhp23 314: I----QIQITQEESESIDRLCELGFCRNIVIOAYLACDKNEELAANFLFEHGHSEDEP- 368

```

Fig. 4-2C. NCRAD23 アミノ酸配列のアライメント

赤枠内は相同なアミノ酸を表す。scRad23 は出芽酵母、spRhp23 は分裂酵母のアミノ酸配列。アカバシ NCRAD23 は、出芽酵母 Rad23 と 32%、分裂酵母 Rhp23 と 43%の相同性であった。

NCRAD4A と NCRAD4B 共に DNA 結合ドメインなど、機能的なドメインが高度に保存されていた (Fig. 4-2A)。このことから、NCRAD4A、NCRAD4B は出芽酵母 Rad4 と同様に、損傷認識に関与する可能性が示唆された。また NCRAD4A と NCRAD4B 共に分裂酵母の rhp4A と rhp4B に最も高い相同性を示した。NCRAD4A と NCRAD4B 間は 26.8%の Identities、39.9%の Similarity の相同性を示した (Fig. 4-2B)。分裂酵母においては、Rhp4A は NER で機能していることが報告されているが、Rhp4B については NER では機能していないことが報告されている[Fukumoto et al., 2002]。

ncRAD23 遺伝子 (NCU07542.3) は、全長 1152bp で、6 つのエキソンからなる遺伝子であった。塩基配列から予想される NCRAD23 タンパク質は 384 アミノ酸残基であり、アミノ酸配列から予想される分子量は 40kDa であった。*ncRAD23* 遺伝子は、第III連鎖群の右腕に位置し、その近傍には *het-7* 遺伝子があるが、修復系に関与する遺伝子はみられず、新規の遺伝子であると考えられる。また出芽酵母 *RAD23* とそのホモログ遺伝子 ヒト HR23A、HR23B、分裂酵母 *rhp23* のアミノ酸配列のアライメントを行った結果、NCRAD23 は、出芽酵母 *RAD23* に対して 30.3%の Identity と 37.2%の Similarity、ヒト HR23A に対して 29.6%の Identities と 42.4%の Similarity、ヒト HR23B に対して 34.2%の Identities と 42.7%と Similarity、分裂酵母 *rhp23* に対して 43.5%の Identities と 51.8%の Similarity の相同性を示した (Fig. 4-2C)。しかし、UBA ドメインや UBL ドメインなどの 4 つの機能ドメインは高度に保存されていた。このことから NCRAD23 に関しても、HR23B や *Rad23* と同様にユビキチンを介した proteasome との相互作用により NER を調節している可能性が示唆された。

4-3-2 相同組換え法による *ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 遺伝子破壊株の単離

これまで *mus-43*, *mus-44* 変異株は RIP 法により遺伝子破壊を行ってきたが、*ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 遺伝子は外来遺伝子の導入による相同組換え法により、遺伝子破壊株を作成した。これまでアカパンカビで主流であった RIP 法では、変異原に対する感受性を指標として遺伝子破壊株を同定するため、変異原に感受性を示さない破壊株の同定は困難であった。

NER 上流域では、DNA 損傷の修復に対して GGR と TCR の二つの損傷認識経路が相補して機能することが考えられており、上流で機能することが予想された *ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 遺伝子破壊株は紫外線に対する感受性が低いことが予想された。

4-3-3 *ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 破壊株の変異原感受性

ncRAD4A, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 破壊株の変異原感受性試験

得られた *ncRAD4A* 破壊株、*ncRAD4B* 破壊株、*ncRAD23* 破壊株とこれらの株間での二重変異株について、スポットテストにより紫外線、4NQO、MMS に対する感受性を調べた結果、*ncRAD4A*、*ncRAD23* 破壊株は 4NQO に対してのみ感受性を示した。出芽酵母 *Rad4*, *Rad23* 変異株では紫外線に対し感受性を示すことが分かっているが、アカパンカビ *ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 破壊株は紫外線に対して感受性がみられず、TCR 相補している結果だと予想した[Friedberg et al., 2006]。

しかし、*ncRAD4A*, *ncRAD23* 破壊株は、アカパンカビ第二除去修復の変異株である *mus-18* 変異株との二重変異株において紫外線と 4NQO に高い感受性を示し、複製後修復系 *Uvs-2* 変異株との二重変異株も紫外線、4NQO に高い感受性を示した。また組換え修復系 *Mei-3* 変異株との二重変異株では紫外線と MMS に対し若干の感受性を示した。

ncRAD4A mus-38 二重変異株、*ncRAD23 mus-38* 二重変異株の感受性は *mus-38* 変異株の感受性と相違がないことから、*ncRAD4A*, *ncRAD23* が NER に関与することが強く示唆された。そして *ncRAD4B* 破壊株との二重変異株では、親株より高い感受性を示す株は確認されなかった。

4-3-4 *ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* におけるエピスタシス解析

ncRAD4A, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 破壊株の紫外線に対する感受性を、多重破壊株を作成してさらに詳細に調べた。

(i) *ncRAD4A* 破壊株とその二重変異株の紫外線に対する感受性

ncRAD4A 破壊株は紫外線に対し野生株と同程度の感受性しか示さなかった (Fig. 4-3)。そこで *ncRAD4A* が NER に関与する遺伝子であることをさらに調べるために、他の修復遺伝子の変異株と、また、それらとの二重変異株での紫外線に対する生存曲線を調べた。その結果、第二除去修復経路 *mus-18* 変異株、組換え修復経路 *mei-3* 変異株、副生後修復経路 *Uvs-2* 変異株との二重変異株では親株より高い感受性を示した (Fig. 4-4)。これに対して、*mus-38* 変異株との二重変異株は *mus-38* の感受性と同程度の感受性を示した。 (Fig. 4-4A)。第二除去修復経路、組換え修復経路、複製後修復経路との二重変異株が単一変異株より感受性が上昇したことより、*ncRAD4A* 遺伝子が DNA 修復において何らかの機能を持つことが明らかになるとともに、これら

の修復経路とは異なる経路で機能していることが明らかとなった。さらに、*ncRAD4A* が *mus-38* との二重変異株では *mus-38* 変異株と同程度の紫外線感受性を示すことから、*mus-38* と同一の経路である NER 経路で機能していることが示唆された。

(ii) *ncRAD4B* 破壊株とその二重変異株の紫外線に対する感受性

ncRAD4B 破壊株は紫外線に対して野生株と同程度であり、紫外線に対する感受性はみられなかった (Fig. 4-5)。そこで、*ncRAD4A* 破壊株と同様に、*ncRAD4B* 破壊株と他の修復系との二重変異株を作成し、紫外線に対する感受性を確認した。その結果、*ncRAD4A* 破壊株と異なり、*ncRAD4B* では *mus-38*、*mus-18*、*Uvs-2* 変異株との二重変異株では親株と同等の感受性を示した (Fig. 4-5)。これに対して、*mei-3* 変異株との二重変異株においてのみ親株より高い感受性を示した (Fig. 4-5D)。この結果は、*ncRAD4B* 遺伝子は組換え修復系には関与しないことが確認され、また他の修復系には関与する可能性が示唆されたが、*ncRAD4B* の単一変異株がもともと紫外線に対して感受性を示さないことから、これらの修復系に実際に関与しているかはさらなる実験が必要である。

(iii) *ncRAD23* 破壊株とその二重変異株の紫外線に対する感受性

ncRAD23 破壊株も *RAD4A*、*RAD4B* と同様に、単一変異株では紫外線に対して感受性を示さなかった (Fig. 4-6)。*ncRAD23* 破壊株と他の修復系に関与する遺伝子変異株との二重変異株は、*ncRAD4A* 同様、穏やかではあるが *mus-18*、*mei-3*、*Uvs-2* 変異株との二重変異株で親株より高い感受性を示し、*mus-38* 変異株との二重変異株は *mus-38* の感受性と同程度であった (Fig. 4-6A)。この結果より、*ncRAD23* が *mus-38* と同一の NER 経路で機能していることが示唆された。

(iv) *ncRAD4A*、*ncRAD4B*、*ncRAD23* 多重変異株の作成および解析

紫外線に対する生存率の結果より、*ncRAD4A*、*ncRAD4B*、*ncRAD23* 破壊株は単一では紫外線に感受性を示さなかった。出芽酵母 Rad4 は Rad23 と相互作用し、ヒト XPC は HR23B と相互作用することが知られている [Fukumoto et al., 2002]。そこで、*ncRAD4A*、*ncRAD4B*、*ncRAD23* が互いに相互作用して機能しているのではないかと考え、これらの多重変異株の紫外線に対する生存率を調べた。その結果、*ncRAD4A ncRAD4B* 二重変異株において、紫外線に感受性がみられた (Fig. 4-7A)。したがって、*ncRAD4A*、*ncRAD4B* 両遺伝子は修復系に関わる遺伝子であることが明らかになった。

さらに、*ncRAD23* との相関を解析したところ、*ncRAD4A ncRAD4B ncRAD23* 三重変異株は、*ncRAD4A ncRAD4B* 二重変異株、*ncRAD4A ncRAD23* 二重変異株と同程度の感受性になることが明らかになった。さらに、これらの多重変異株の紫外線に対する感受性は、すでに NER 変異株として解析されている *mus-40* 変異株の紫外線に対する感受性と同程度になることが明らかになった。しかしながら、*ncRAD4B ncRAD23* 二重変異株は紫外線に対して感受性を示さなかった (Fig. 4-7B)。以上より、*ncRAD4A* が NER で主要な役割を果たし、*ncRAD4B*、*ncRAD23* が補助的な役割を担っている可能性が示唆された。また、*ncRAD4A ncRAD4B* 二重変異株は紫外線に対する感受性を示したことから、*ncRAD4B* が NER に関与している可能性も示唆された。また *mus-18* をバックグラウンドにおいた場合も同様の傾向の結果を得た。

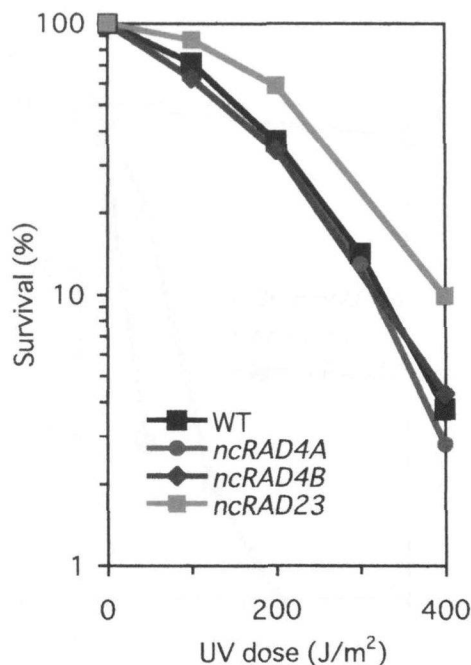


Fig. 4-3. *ncRAD4*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 破壊株の紫外線に対する感受性

野生株と比較して、*ncRAD4*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 破壊株は紫外線に対する感受性はみられなかった。

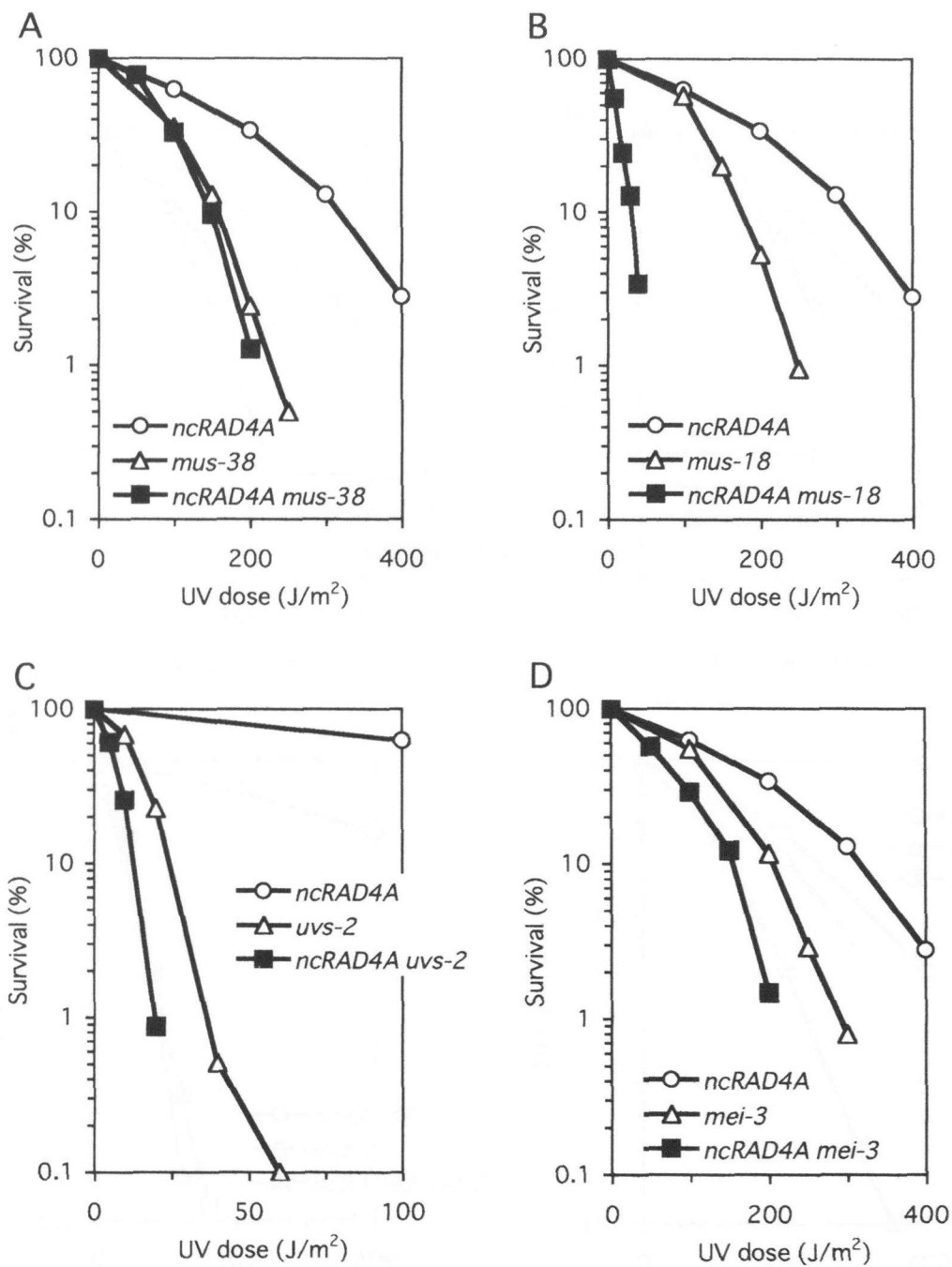


Fig. 4-4 . *ncRAD4A* 破壊株のエピスタシス解析

(A)NER 系 *mus-38* 変異株、(B)第二除去修復系 *mus-18* 変異株、(C)組換え修復系 *mei-3* 変異株、(D)複製後修復系 *uvs-2* 変異株との二重変異株の紫外線に対する感受性をそれぞれ調べた。

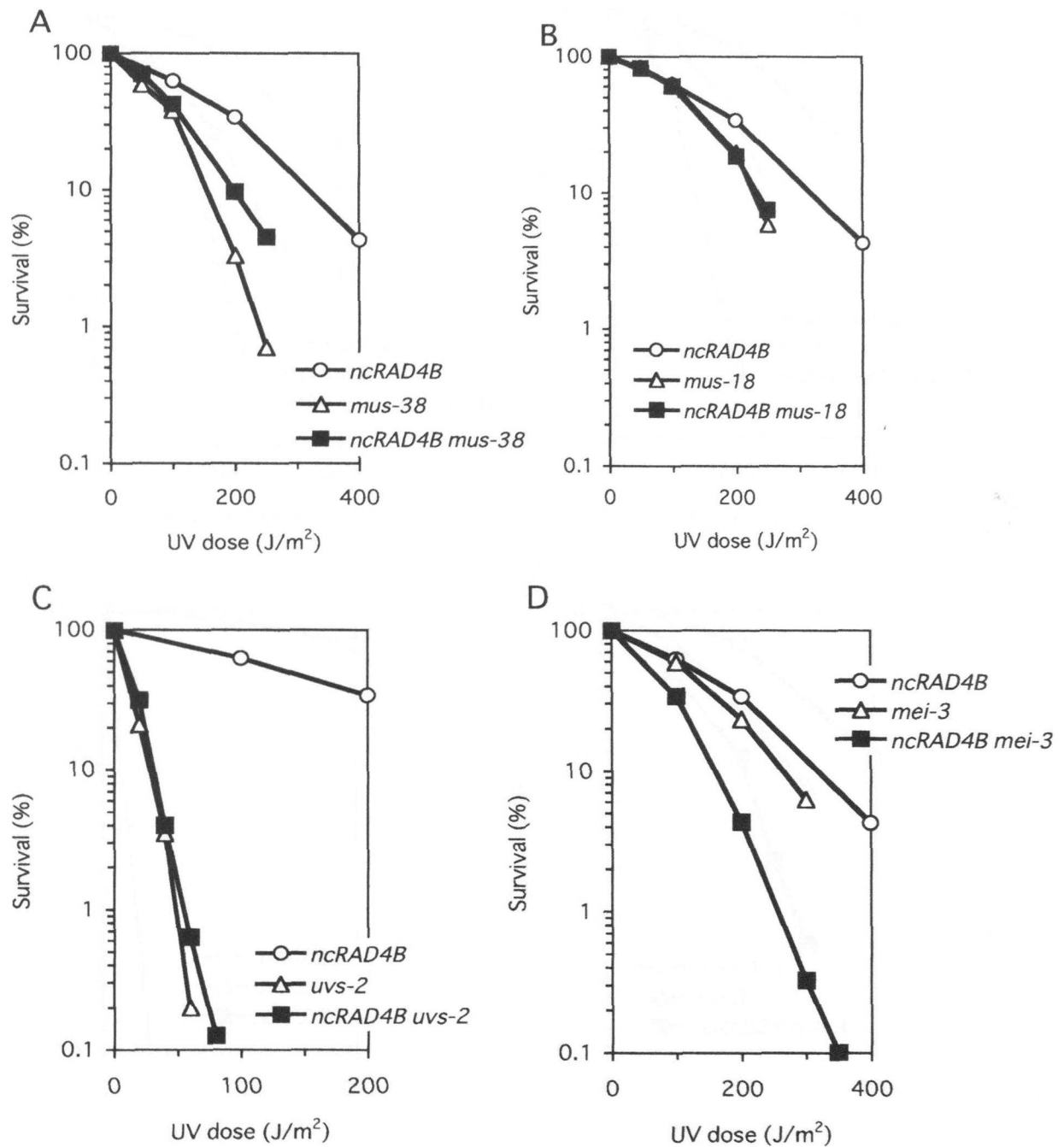


Fig.4-5. *ncRAD4B* 破壊株のエピスタシス解析

(A)NER 系 *mus-38* 変異株、(B)第二除去修復系 *mus-18* 変異株、(C)組換え修復系 *mei-3* 変異株、(D)複製後修復系 *uvs-2* 変異株との二重変異株の紫外線に対する感受性をそれぞれ調べた。

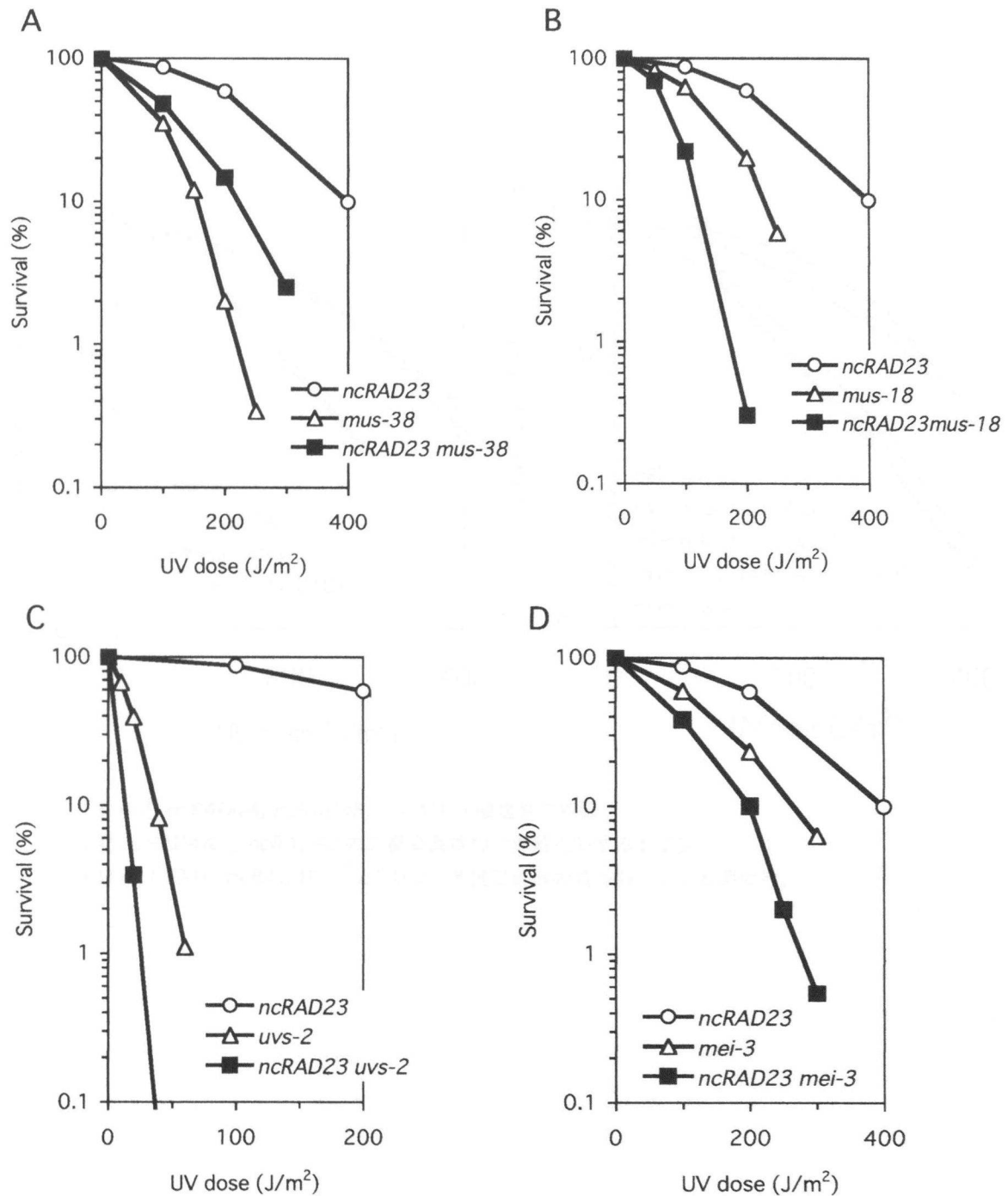


Fig.4-6. *ncRAD23* 破壊株のエピスタシス解析

(A)NER 系 *mus-38* 変異株、(B)第二除去修復系 *mus-18* 変異株、(C)組換え修復系 *mei-3* 変異株、(D)複製後修復系 *uvs-2* 変異株との二重変異株の紫外線に対する感受性をそれぞれ調べた。

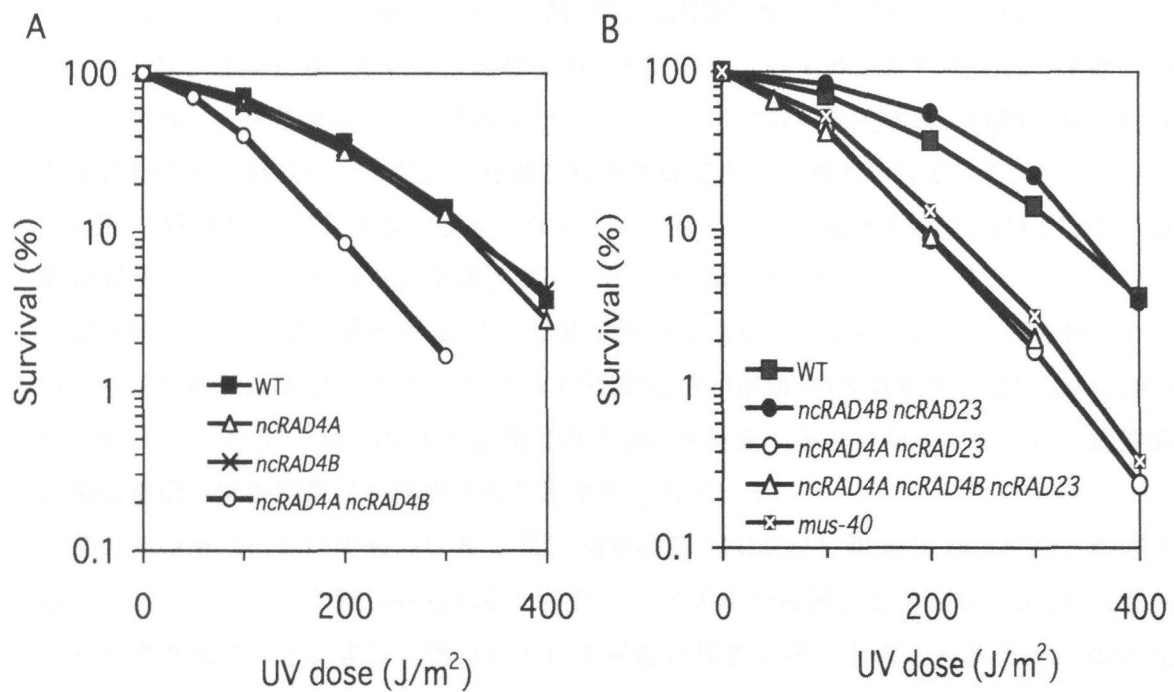


Fig.4-7. *ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD23* 破壊株の相関

(A) *ncRAD4A* と *ncRAD4B* の二重変異株の紫外線に対する感受性。

(B) *ncRAD4A*, *ncRAD4B* と *ncRAD23* 多重変異株の紫外線に対する感受性。

第5章 アカパンカビ *ncRAD26* 遺伝子の解析

5-1 緒言

NER には、ゲノム全体を対象とした損傷認識 GGR (global genome repair) と、転写と共役して転写鎖上の損傷 DNA を選択的に認識する TCR (transcription-coupled repair) の二つの損傷認識経路が存在する。紫外線によって誘起される DNA 損傷 (チミン二量体、6-4 光産物) の大多数が NER によって除去・修復され、細胞に突然変異が生じるのを未然に防ぎ、非常に重要な修復機構であると考えられている。

NER の重要性は NER タンパク質を欠くことによって、色素性乾皮症 (XP) やコケイン症候群 (CS) といった重篤なヒト遺伝病となることから分かる。

出芽酵母の *RAD26* 遺伝子は TCR 特異的因子であることが知られ、ヒトにおいてはコケイン症候群原因遺伝子として *CSA*, *CSB* 遺伝子が単離・同定されている [Mayne and Friedberg, 1995]。ヒトの XP 疾患は皮膚がんを発症するのに対し、コケイン症候群の原因遺伝子は神経異常を発症することが知られている。

アカパンカビにおいても、ヒト *CSB*、出芽酵母 *RAD26* に相同な *ncRAD26* が存在し、これらのタンパク質にみられるヘリケースドメインを保持しており、DNA 二重らせんを巻き戻すことにより、転写において重要な役割を担うと考えられた [Friedberg, 1996]。

本章では、出芽酵母の *RAD26* のホモログ遺伝子であるアカパンカビ *ncRAD26* 遺伝子の機能解析を行い、アカパンカビにおける NER TCR 損傷認識の解明を目的とした。

5-2 材料と方法

[使用菌株とベクター]

本実験で使用したアカパンカビの株とその遺伝子型を Table 5-1 に示した。アカパンカビ野生株として、C1-T10-37A と C1-T10-28a をそれぞれ使用した[Tamaru and Inoue, 1989]。 *mus-38* 変異株 (CZ-272-16A, CZ-272-5a)、 *mus-18* 変異株 (C2-T40-9A)、 *mei-3* 変異株 (FGSC2764A)、 *uvs-2* 変異株 (74-OR244-3A) は、埼玉大学遺伝学研究室より頂いた。プラスミド構築に使用した大腸菌の株とその遺伝子型を Table 5-2 に示した。PCR 増幅 DNA 断片のクローニングには pT7Blue® (Novagen)を使用し、アカパンカビの形質転換には pCB1003 と pBARMTE1 をベクターとして用いた。pCB1003 プラスミドには、アカパンカビ細胞内で機能する選択マーカーとしてハイグロマイシン B 耐性遺伝子(*hygB*)が挿入されており、pBARMTE1 プラスミドには、アカパンカビ細胞内で機能する選択マーカーとしてハイグロマイシン B 耐性遺伝子が挿入されている。アカパンカビゲノムライブラリー (pMOcosX) [Orbach and Sachs, 1991]は、FGSC(Fungal Genetics Stock Center)より入手した。

Table 5-1. Strains of *N.crassa* used in this study

Strain number	Genotype	Source/reference
C1-T10-37A	A	Tamaru and Inoue (1989)
C1-T10-28a	A	Tamaru and Inoue (1989)
CZ-272-16A	A <i>mus-38</i>	Ishii et al.(1998)
CZ-272-5a	a <i>mus-38</i>	Ishii et al.(1998)
C2-T40-9A	A <i>al-2 pan-2 cot-1 mus-18A</i>	Ishii et al.(1991)
74-OR244-3A	A <i>al-2 pan-2 cot-1 uvs-2</i>	De Serres et al. (1980)
FGSC2764A	A <i>mei-3</i>	FGSC
SE-HA-26A	<i>ncRAD26A matA</i>	This study
C2-SE-26A	<i>mus-18 ncRAD26</i>	This study
CZ-HA-26	<i>mus-38 ncRAD26</i>	This study
T2-HA-26	<i>mei-3 ncRAD26</i>	This study
OR-HA-26	<i>uvs-2 ncRAD26</i>	This study

FGSC, Fungal Genetic Stock Center

Table 5-2. Strains of *E. coli* used in this study

Strain number	Genotype
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), e14- (mcrA-), supE44, relA1, Δ (lac-proAB)/F' [traD36, proAB+, lacIq, lacZ Δ M15]</i>
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F-, φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1</i>

[培養]

アカパンカビの培養には、VM 培地（1×Vogel 最少培地，1.2 %（w/v） ショ糖）を使用し、寒天培地には 1.2 %（w/v） 寒天を加えた[Vogel, 1964]。ハイグロマイシン B 耐性の形質転換体の選抜には、最終濃度 0.5mg/ml のハイグロマイシン B を培地に加えて行った。アカパンカビの分生子形成は、グリセロール完全培地（1×Vogel 最少培地，1 %（v/v） グリセロール，0.25 %（w/v） yeast extract，0.1 %（w/v） カザミノ酸，0.5 %（w/v） malt extract，1 %（v/v） ビタミンストック溶液，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて、1 週間培養することで行った。アカパンカビの交配は、SC 培地（1×Westergaards' 合成培地，1.2%（w/v） ショ糖，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて行った。アカパンカビのコロニー形成には、コロニー形成培地（1×Vogel 最少培地，0.2 %（w/v） ショ糖，1 %（w/v） ソルボース，1.2 %（w/v） 寒天）を用いて行った。基本培地の成分は、Table 5-3 にまとめた。

大腸菌の培養には、LB 培地（1 %（w/v） バクトトリプトン，0.5 %（w/v） 酵母エキス，1 %（w/v） 塩化ナトリウム）を使用し、寒天培地には 1.2 %（w/v） 寒天を加えた。アンピシリン耐性の選抜には、アンピシリンを最終濃度 0.5mg/ml になるように加えて行った。

Table 5-3. Mediums used in this study

50×Vogel's 最少培地(1000ml 中)	
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	125g
KH_2PO_4	250g
KH_4NO_3	100g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5g
ビオチン水溶液	25ml
Vogel's 微量元素液	5ml
Vogel's 微量元素液(100ml 中)	
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25g
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05g
H_3BO_3	0.05g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05g
ビオチン水溶液 (1000ml 中)	
Biotin	40mg
ビタミンストック溶液 (100ml 中)	
サイアミン (ビタミン B1)	10mg
リボフラビン (ビタミン B2)	5mg
ピリドキシン (ビタミン B6)	5mg
パントテン酸カルシウム	50mg
パラアミノ安息香酸	5mg
ニコチン酸アミド	5mg
塩酸コリン	100mg
葉酸	1mg
イノシトール	100mg
10×Westergaards' 合成培地(1000ml 中)	
KNO_3	10g
KH_2PO_4	10g
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
NaCl	1g
CaCl_2	1.3g
Vogel's 微量元素液	10ml
ビオチン水溶液	10ml

[基本的な遺伝子工学的手法]

プラスミド DNA の少量調整などの基本的な遺伝子工学的手法は、Sambrook による方法 [Sambrook et al., 1989]に従った。大腸菌の形質転換は、Perbal の実験書 [Perbal (1988)]に従った。コンピテント細胞作製には、JM109 株、DH5 α 株を使用した。精製した DNA の確認はアガロース電気泳動により行なった。

[サザンハイブリダイゼーション]

アガロースゲルからメンブレンへ DNA を移行するために、キャピラリートランスファーまたは VacuGene™ blotting system (Pharmacia)を使用した。メンブレンは、Hybond-N⁺(Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。DIG によるプローブの標識法として、ランダムプライム法を用いた。ランダムプライム法には、DIG ハイプライム(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を使用した。メンブレンとプレハイブリダイゼーション溶液を耐熱性のタッパーに入れ、68℃で 2~3 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、熱変性させた標識プローブをタッパーに加え、15 時間以上 68℃で保温した。

ハイブリダイゼーション後の検出は、基質として NBT(ニトロブルーテトラゾリウムクロライド)と BCIP (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸)を用いた発色反応により行なった。まず、メンブレンを室温で No.1 洗浄液(2×SSC、0.1% SDS)で 5 分間、2 回洗浄し、次に 68℃で No.2 洗浄液(0.1×SSC、0.1% SDS)で 15 分間、2 回洗浄した後、Wash Buffer[0.3% Tween-20® in Buffer1(0.1M マレイン酸、0.15M NaCl ; pH7.5)]で 1 分間洗浄した。その後、Blocking Buffer (1% Blocking stock solution in Buffer1)で 30 分間インキュベーションした後、20ml の希釈抗体溶液(150mU AP 標識抗ジゴキシゲニン抗体、Fab フラグメント/ml Buffer)で 30 分間インキュベーションした。次に、Wash Buffer で 15 分間、2 回洗浄した後、メンブレンを検出 Buffer(100mM Tris-HCl、100mM NaCl、50mM MgCl₂ ; pH9.5)で 2 分間平衡化した。そして、暗冷下で、10ml の発色溶液(200 μ l NBT/BCIP 溶液/10ml 検出 Buffer)と共にメンブレンをインキュベーションし、発色反応させて検出した。

[PCR]

PCR 法による、DNA の増幅には、Taq Polymerase、KOD DNA Polimerase (TOYOBO) 、LA Taq Polymerase (TAKARA) を使用した。

(Taq Polymerase)

0.2ml のマイクロチューブに、鋳型 DNA (0.05 μ g)、プライマー (0.5 μ M)、10 \times 緩衝液[100mM Tris-HCl, 500mM KCl(20℃で pH8.3)、dNTP 混合液 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP が各 2.0mM) を 5 μ l、25mM 塩化マグネシウム溶液を 3 μ l、Taq Polymerase を 1 μ l 入れて、純水 (D.W.) で全量 50 μ l になるように調整した。

(KOD DNA Polymerase)

0.2ml のマイクロチューブに、鋳型 DNA (0.05 μ g)、プライマー (0.5 μ M)、10 \times 緩衝液[50mM Tris-HCl(pH8.0)、0.1mM EDTA、1mM DTT、0.001% Tween-20、0.001% Nonidet P-40、50% Glycerol] を 5 μ l、dNTP 混合液 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP が各 2.0mM) を 5 μ l、25mM 硫酸マグネシウム溶液を 2 μ l、KOD-plus-を 1 μ l 入れて、純水 (D.W.) で全量 50 μ l になるように調整した。

(LA Taq Polymerase)

0.2ml のマイクロチューブに、鋳型 DNA (0.05 μ g)、プライマー (0.2 μ M)、2 \times GC 緩衝液 (5mM のマグネシウムを含む) を 25 μ l、dNTP 混合液 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP が各 2.0mM) を 6 μ l、LA Taq を 1 μ l 入れて、純水 (D.W.) で全量 50 μ l になるように調整した。

また全てのプライマーの合成と精製は、日本バイオサービス社に依頼した。プライマーの塩基配列と名前を Table 5-4 に示す。

Table 5-4. 本実験に使用したプライマーの名前と塩基配列

RAD26C	5' -TAC CTG TTT GCC ATT CCT TCC TCC -3'
RAD26H	5' -GTC GTG ACT GGA AAA CCA GTT TTG TGT GTT GGG GGA C-3'
RAD26FA	5' -GTC GTG ACT GGG AAA ACT GAT AGT CGA AGA GAG CTG GGT A-3'
RAD26FB	5' -TAC CCA GCT CTC TTC GAC TAT CAG TTT TCC CAG TCA CGA C-3'
RAD26FC	5' -GCC TCA CAA ATG CCT CGA TGA CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
RAD26FD	5' -GTC ATA GCT GTT TCC TGT CAT CGA GGC ATT TGT GAG GC-3'
RAD26H	5' -AAA ACC GCC CTT ATA CCT CTG G-3'
M13-M4	5' -GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'
M13-R	5' -CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
HY	5' -GGA TGC CTC CGC TCG AAG TA-3'
YG	5' -CGT TGC AAG ACC TGC CTG AA-3'

[アカパンカビからのゲノム DNA の調整]

アカパンカビからのゲノム DNA の調整は、Irelan らの方法[Irelan.J.et.al 1993]を改変して行った。30ml の VM 液体培地に少量の菌糸を加え、30℃で 2 日間振とう培養した後、培養液を濾過して菌糸を集めた。この菌糸を液体窒素で瞬間冷凍して、ゲノム DNA の調整に用いた。適量の菌糸に Isolation Buffer(50mM Tris-HCl[pH8.0]、170mM EDTA[pH8.0]、1% N-louroylsarcosin)を 500 μ l、ガラスビーズを加え、ビーズビーターで細胞を粉砕した。7.5M 酢酸アンモニウム、フェノール、PCI(フェノール:クロロホルム:イソアルミアルコール=25:24:1)を加え、除蛋白を行った後、イソプロパノール沈殿を行い、ゲノム DNA を抽出した。これに RNaseI を加え、RNA を分解後、PEG (1.6M NaCl、13% polyethylene glycol) 沈殿を行い、ゲノム DNA 溶液とした。

DNA は吸光度計を用いて定量後、PCR や、サザンハイブリダイゼーションなどに用いた。

[アカパンカビの遺伝学的解析]

アカパンカビの交雑など遺伝学的解析は Davis と de Serres の方法 [Davis and de Serres, 1970] に従って行なった。

[アカパンカビの変異原感受性]

変異原処理したアカパンカビの生存率の測定は、Inoue と Ishii の方法 [Inoue and Ishii, 1984] に従った。

アカパンカビ分生子を 1/15M リン酸緩衝液[pH7.0]に懸濁し、 1×10^6 個/ml の懸濁液とした。これを 9cm シャーレに 20ml ずつ加え、そこに紫外線を照射した。紫外線は $2.5 \text{ J/m}^2 \cdot \text{sec}$ の強度で照射した。照射後、100 μ l 採取し希釈した後、1000 個をコロニー形成用寒天培地に混ぜて 15cm シャーレにひろげ、30℃で 3 日間培養して現れたコロニーを数え、これをもとに生存率を求めた。

[スポットテスト]

アカパンカビの変異原に対する感受性を調べるために、スポットテストを行った。培地として、コロニー形成培地を用いた。

4NQO(4-nitroquinoline-1-oxide)、MMS(methylmethane sulfonate)はオートクレーブ滅菌後の培地が 60℃以下になった後に加え、一様にシャーレに広げた。感受性を調べる株の分生子を滅菌水に懸濁し、この懸濁液を寒天培地上にパスツールピペット

を用いてスポットした後、28℃で2日間培養し、菌糸の増殖を調べた。

紫外線に対する感受性は、変異原を添加していない上述のプレート上に分生子の懸濁液をスポットした後、50～400J/m²の紫外線を照射し、暗条件下で28℃、2日間培養し、菌糸の増殖を調べた。

[遺伝子の破壊株の作成]

遺伝子の破壊株は、fusion PCR 法により破壊用断片を作成した後、その断片をアカパンカビに形質転換し、相同組換えにより遺伝子破壊株を作成した。fusion PCR 法は、まずプライマーAとBで遺伝子の5'側を、CとDで3'側を、EとFで選択マーカーとしてハイグロマイシンB耐性遺伝子をPCR法により増幅した。このときプライマーBとE、CとFがそれぞれ相補的になるようにハイブリッドに設計しておいた。続いて先ほどPCR法で増幅した3つの断片を混合し、プライマーAとDを用いてPCR法を行うと、ハイブリッドに形成した部位がプライマーとなり選択マーカーを含む遺伝子破壊用断片を作成した(Fig. 5-2)。遺伝子破壊株の確認は、PCR、サザンハイブリダイゼーションにより確認した。

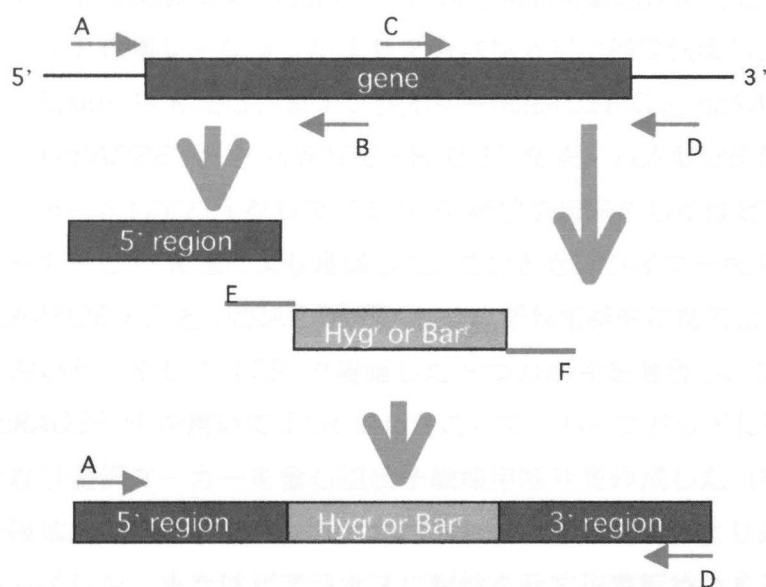


Fig. 5-1. Fusion PCR の概略

5-3 結果と考察

5-3-1 アカパンカビ *ncRAD26* 遺伝子の検索

NER モデルの TCR に関与することが予想される出芽酵母 *Rad26* 遺伝子をアカパンカビのゲノムプロジェクトデータベースより検索した。出芽酵母 *Rad26* に相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子 (NCU07837.3) を見つけ、*ncRAD26* と名付けた。この遺伝子は分裂酵母 *rhp26* と相同性が極めて高く、アカパンカビの TCR で機能することが推測された。

データベースでの検索の結果、分裂酵母と 36%、ヒト CSB と 34%の相同性を示し、この遺伝子は第三連鎖群左腕に位置し、内部に 127bp のイントロンを含んでいた。これらの遺伝子は、SNF2 ドメインと Helicase C ドメインを持つことが知られており[V. Mayne and Errol C. Friedberg, 1995]、この領域は高度に保存されていた(Fig. 5-2)。*ncRAD26* 遺伝子も *ncRAD4A* と同様に外来遺伝子の導入による相同組換え法で遺伝子欠失型の破壊株を単離した。

5-3-2 相同組換え法による *ncRAD26* 遺伝子破壊株の単離

遺伝子の破壊株は、fusion PCR 法を用いて破壊用断片を作成したあと、その断片をエレクトロポレーションによりアカパンカビに形質転換し、相同組換えにより作成した。fusion PCR 法は、まずプライマー *ncRAD26 C* と *ncRAD26 FA* で遺伝子の 5' 側を、*ncRAD26 FD* と *ncRAD26 H* で 3' 側を、*ncRAD26 FB* と *ncRAD26 FC* で選択マーカーとしてハイグロマイシン B 耐性遺伝子もしくはピアラホス耐性遺伝子の選択マーカーを PCR 法により増幅した。このときプライマー *ncRAD26 FA* と *ncRAD26 FB*、*ncRAD26 FC* と *ncRAD26 FD* がそれぞれ相補的になるようにハイブリッドに設計しておいた。そして PCR で増幅した 3つの断片を混合し、プライマー *ncRAD26 C* と *ncRAD26 H* を用いて PCR を行うことで、ハイブリッドに形成した部位がプライマーとなり選択マーカーを含む遺伝子破壊用断片を作成した (Fig. 5-3)。作成した遺伝子破壊用断片をアカパンカビに導入し、相同組換えにより遺伝子破壊を行い、ハイグロマイシン、またはピアラホスに耐性を示す形質転換体を選抜し、*ncRAD26* 破壊株を同定した。

CSB	241:	RTG-QMTPF	RTQIPQKQEKKE	KIMLNEASGFEKYLADQAKL-SFE-	KKQGCNKRAAE	296																																																			
NCRAD26	1:	-----	-----	-----	-----	1																																																			
spRhp26	2:	SVNEDLSHL	VFSVDQENLE	EDVTNTAS-EYIAHESREIEKKRLQKV	KEISSVKEKIE	59																																																			
CSB	297:	KAPAPVTPPAPVON	ENKPNKARVLSKKEER	KKHIKKLQK	ELQFQGGKVL	KARRPW	355																																																		
NCRAD26	1:	-----	-----	-----	MDPDTTOLSKTT	12																																																			
spRhp26	60:	RLDERIDSRLTKISV	ENFRRQLSKFRDTLQS	QSDENDIKR	ENNEDSANAE	SIG-AF	117																																																		
CSB	356:	ESD-MRPRAEGDS	EGESEE--YFPTEEE	EEEDDEVEGA	EADLSGDTG	DEYELKPLPKGGK	412																																																		
NCRAD26	13:	EALPELTPNVEH	TEAMTLDNKS	SAADTQSA	PNADDELDEE	AALKPLTENVRDQDDLERDIT	72																																																		
spRhp26	118:	STEELERQELIRT	CKVTPFRRL	SLGLOKEVDF	DESSIREAVIK	SEGTYYETAE	170																																																		
CSB	413:	PKKKVYVCH	IDDFFSSCE	FAENASGEGGGGGK	LVGRYRDDGE	EDYKQRLRRN--	469																																																		
NCRAD26	73:	LCASRALIE	ASQKRDOKRIE	AAEATRLENOK	--KTOOQKLR	ETNPTA	RLRIQOEI	129																																																	
spRhp26	171:	HLSEPSNI	EHGI	IFRDEKDEYV	MDAVTE--	SVMTAAI	DDGDLV	QRLNAMCAN	225																																																
CSB	470:	KLRHDOKEKRL	-----KLEDD	-----E-ESDA--E-EDE--	GEKVPGLFK	LEKLYQ	513																																																		
NCRAD26	130:	---	ARIDAEIELCK	DIADFRARID	QRNOQGET	GT-LAPAT	CKILNETOREYLI	RTG	183																																																
spRhp26	226:	RDELRLQAS	ASENNKIRGDE	FEGKDEWLL	FRPSKKQOTEG	--GETIP	QDIRPH	FRYQV	283																																																
CSB	514:	C	RLWEL	CCAGGIL	DEMGLGKTIQI	I--AFLAG	SYKIR	TRSNYRE	ELG	569																																															
NCRAD26	184:	KITP	-FAKFGG	PRPAEVEGL	LANAIVDAE	DAVAEE	LEEKENDG	FFSHONL	-ELP	FADE	241																																														
spRhp26	284:	C	RLWEL	CCAGGIL	DEMGLGKTIQI	V--SFLS	SHS	-----	CK	-EOK	-PA	329																																													
CSB	570:	VIVCH	IVM	QVNEFHTW	WIFRVAL	LHETG	-----SY	-----	B	-----	604																																														
NCRAD26	242:	NEVATVAM	ADDFS	--LRPRKR	RVQPP	ESDDEFVLG	-E-SGSE	AASPEAD	ASDDYDDY	296																																															
spRhp26	330:	ILVCH	IVM	QVNEFHTW	WIFRVAL	LHETG	SGORASR	CKROYES	DASESE	ESK	SI	389																																													
CSB	605:	-----	HKKE	L-IR	MAHCH	IL-IT	SYIL	LMCE	HSRY	LM	IL	DEGHKIR	653																																												
NCRAD26	297:	EMAGT	--TLK	RKRAVR	ADGD--	DKVD	ITGIDDG	NEKVYO	ARLKQ	AVTR	RSNAR	-RAN	351																																												
spRhp26	390:	KLR	ASSSF	RYAN	LVSE	VF-TR	CHIL	IT	YAGL	SIY	EL	LPRE	QCY	LV	DEGHKIR	448																																									
CSB	654:	ENAAVT	LACK	FE	-PHR	ILSG	TH	ONNL	ELW	LDF	FF	PG	LG	TL	LPV	FM	EO	FS	V	711																																					
NCRAD26	352:	ORLGQ	FD	DDDG	TE	EWK	PA	DOP	PHO	FE--	NG--	--LK	PCD	--	YH	AL	FOY	ETS	-V	402																																					
spRhp26	449:	EDSEIS	SEK	IE	-IVN	ILSG	TH	ONNL	ELW	LDF	FF	PG	LG	TL	LPV	FM	EO	FS	V	506																																					
CSB	712:	T-MGG	-YENAS	IVQV	KAYK	CAC	MLR	-T	HPYLL	RRM	KSE	-MK	SE	SLP	-D	NE	QV	LF	765																																						
NCRAD26	403:	QWLAE	LYA	QVGG	IV	GDEM	-G--	L	G	TG	-M--	FSP	PL	G	I	H	G	T	L	T	G	S	A	T	D	F	452																														
spRhp26	507:	N-IGG	-YANAS	IVQV	KAYK	CAC	MLR	-T	HPYLL	RRM	KSE	-MK	SE	SLP	-D	NE	QV	LF	558																																						
CSB	766:	-P	LT	DE	CH	MY	QNE	VDS	KE	VYR	IL	NG	EM	IF	S	GL	IAL	-K	C	N	H	P	D	L	V	822																															
NCRAD26	453:	GVV	-IL	OS	-K	AT	R	H	CC	SP	GN	S	F	A	S	M	G	K	R	V	S	-H	V	A	T	S	S	I	H	-P	L	V	Q	W	H	A	C	P	Q	R	B	507															
spRhp26	559:	-P	LT	PL	DE	K	AY	CE	L	Q	S	M	Q	K	IL	NG	K	M	L	Y	I	D	I	L	-K	C	N	H	P	D	L	V	-T	-R	E	Y	L	-E	611																		
CSB	823:	PDDELE	EDQ	F	Y	W	K	R	S	G	K	M	I	V	E	S	L	K	I	M	K	O	G	E	V	L	L	F	S	O	S	R	O	M	L	D	I	L	E	I	G	L	D	L	P	D	V	H	881								
NCRAD26	508:	SAQ	R	L	R	Q	E	K	A	K	V	Q	P	G	C	E	D	R	R	S	--	R	C	A	M	P	C	A	G	N	L	C	R	F	A	N	V	R	Y	I	T	P	G	R	I	G	L	C	S	G	R	A	T	565			
spRhp26	612:	HKEDY	---	N	Y	D	P	E	K	S	G	K	L	V	I	R	A	L	I	T	L	K	O	C	S	T	L	L	F	S	O	S	R	O	M	L	D	I	L	E	I	G	L	D	L	P	D	V	H	668							
CSB	882:	V	L	K	M	D	G	T	I	L	A	S	R	Q	L	I	T	R	Y	E	D	T	S	I	-V	F	L	L	T	R	V	G	L	G	V	N	L	T	G	A	-R	V	I	Y	D	P	D	W	N	P	S	T	940				
NCRAD26	566:	---	-N	P	K	S	K	H	S	N	H	L	L	O	G	T	S	D	A	Q	P	C	D	S	-F	R	H	A	N	A	E	Q	-D	R	A	M	V	S	L	F	H	L	P	A	T	R	H	L	G	C	L	S	618				
spRhp26	669:	V	C	R	M	D	G	T	I	L	A	S	R	Q	L	I	T	R	Y	E	D	T	S	I	-V	F	L	L	T	R	V	G	L	G	V	N	L	T	G	A	-R	V	I	Y	D	P	D	W	N	P	S	T	727				
CSB	941:	ITG	-AR	E	R	A	W	R	L	G	O	K	K	O	V	I	Y	R	L	T	A	G	T	-I	E	E	K	I	Y	H	R	O	I	F	K	O	F	L	T	N	-R	V	L	K	D	P	K	O	R	R	F	F	K	S	998		
NCRAD26	619:	KSV	R	D	P	D	O	T	N	R	L	C	R	N	-E	S	D	H	C	S	E	M	C	R	D	V	-F	R	D	H	Q	P	---	-I	E	T	S	A	A	O	S	R	R	G	C	R	A	F	T	O	E	671					
spRhp26	728:	ITG	-AR	E	R	A	W	R	L	G	O	K	K	O	V	I	Y	R	L	T	A	G	T	-I	E	E	K	I	Y	H	R	O	I	F	K	O	F	L	T	N	-R	V	L	K	D	P	K	O	R	R	F	F	K	S	785		
CSB	999:	N	D	I	Y	E	L	F	I	T	S	-D	A	S	Q	S	T	E	S	A	I	F	A	G	T	S	D	V	Q	T	P	K	O	-K	R	R	I	Q	E	-A	F	E	A	D	H	D	V	P	K	R	K	F	1057				
NCRAD26	672:	KRT	G	P	I	L	A	V	O	A	P	A	R	G	V	R	A	I	P	O	V	-----	G	H	-----	D	-Y	S	O	Q	D	A	-E	V	P	L	R	Y	L	A	N	M	S	S	R	F	A	S	720								
spRhp26	786:	T	D	L	H	E	L	F	I	L	G	D	N	K	T	E	G	T	-E	T	G	S	M	E	-----	G	-----	S	E	R	V	L	R	-K	D	-----	818																				
CSB	1058:	A	S	N	I	S	V	N	D	A	T	S	S	E	E	K	S	E	A	K	-E	V	N	A	V	T	S	N	F	S	D	E	R	-D	D	P	-M	S	S	N	V	T	S	N	D	-R	L	G	E	T	N	A	S	G	1116		
NCRAD26	721:	AAQ	R	S	L	L	Q	V	G	O	Y	Q	O	V	G	C	E	N	G	S	E	V	I	T	S	H	V	E	T	S	P	E	N	A	A	V	L	P	---	G	Y	S	N	A	G	H	H	G	I	C	A	F	-G	W	H	777	
spRhp26	819:	-----	N	S	S	R	N	-----	G	S	E	A	D	I	P	A	R	D	R	K	-S	-----	K	I	-----	H	-D	K	G	K	K	N	S	849																							
CSB	1117:	P	E	E	L	S	V	I	S	G	N	G	E	C	S	N	S	-G	T	C	T	S	M	P	S	-D	E	S	I	D	E	L	-L	S	Y	K	R	E	R	S	-S	A	Q	T	E	A	F	W	E	N	K	O	M	E	1175		
NCRAD26	778:	Q	---	L	P	T	Y	G	W	O	D	A	-R	O	R	S	A	D	A	C	R	P	V	O	O	P	-L	T	S	L	P	F	N	H	O	S	G	R	T	W	H	O	-D	G	S	P	G	H	L	P	R	E	P	I	N	834	
spRhp26	850:	S	-----	S	-----	S	-----	E	-M	E	I	A	-----	S	-----	M	E	862																																							
CSB	1176:	N	N	E	Y	R	H	K	S	K	T	K	H	H	S	V	A	E	E	T	L	E	S	H	L	---	R	E	K	O	K	---	P	K	N	S	K	H	C	---	R	A	K	F	E	G	T	R	I	P	H	-V	K	K	1228		
NCRAD26	835:	R	C	P	G	O	R	T	C	M	A	V	G	T	K	E	G	S	H	Y	L	P	A	Y	D	S	W	N	H	R	R	N	L	P	H	O	L	---	Q	A	V	P	V	K	G	V	E	G	P	E	A	A	D	I	Q	L	892
spRhp26	863:	K	---	Y	R	P	P	Q	-----	E	S	N	-V	T	I	-----	N	-----	S	-----	E	T	L	G	D	S	V	-----	886																												
CSB	1229:	R	R	Y	O	K	D	S	E	N	K	S	E	A	K	E	Q	S	N	D	D	Y	V	L	E	K	L	F	K	K	S	V	-V	H	E	V	M	K	H	A	I	M	D	G	A	S	P	D	Y	L	V	E	A	E	N	R	1288
NCRAD26	893:	K	P	S	P	V	S	K	L	V	R	R	E	D	R	S	R	A	I	Q	S	O	T	P	A	E	R	T	H	G	D	S	L	A	W	R	H	A	G	---	S	P	G	P	W	S	O	O	T	S	G	---	Q	G	-R	948	
spRhp26	887:	-----	L	D	D	I	E	A	S	-G	I	O	S	T	I	K	H	D	I	E	A	S	O	T	E	S	I	L	V	E	A	E	N	922																							
CSB	1289:	V	A	D	A	L	K	A	L	R	L	S	R	O	R	-L	G	A	V	S	G	V	P	T	N	T	C	H	-G	I	S	-A	P	A	G	---	K	S	-F	G	K	K	N	S	N	1338											
NCRAD26	949:	I	H	K	G	R	D	O	P	P	S	S	R	-L	R	I	G	N	I	Q	R	N	-W	T	G	P	C	T	E	R	-G	G	F	D	G	G	Y	L	C	T	F	Y	S	O	P	T	R	D	H	E	R	O	K	A	1006		
spRhp26	923:	V	A	N	E	A	L	R	A	V	-----	S	-S	F	R	-----	R	-----	G	-----	Q	940																																			

Fig. 5-2. NCRAD26 アミノ酸配列のアライメント

赤枠内は相同なアミノ酸を表す。CSB はヒトのアミノ酸配列、spRhp26 は分裂酵母のアミノ酸配列。アカパンカビ NCRAD26 は、ヒトと 34%、分裂酵母と 36%の相同性であった。

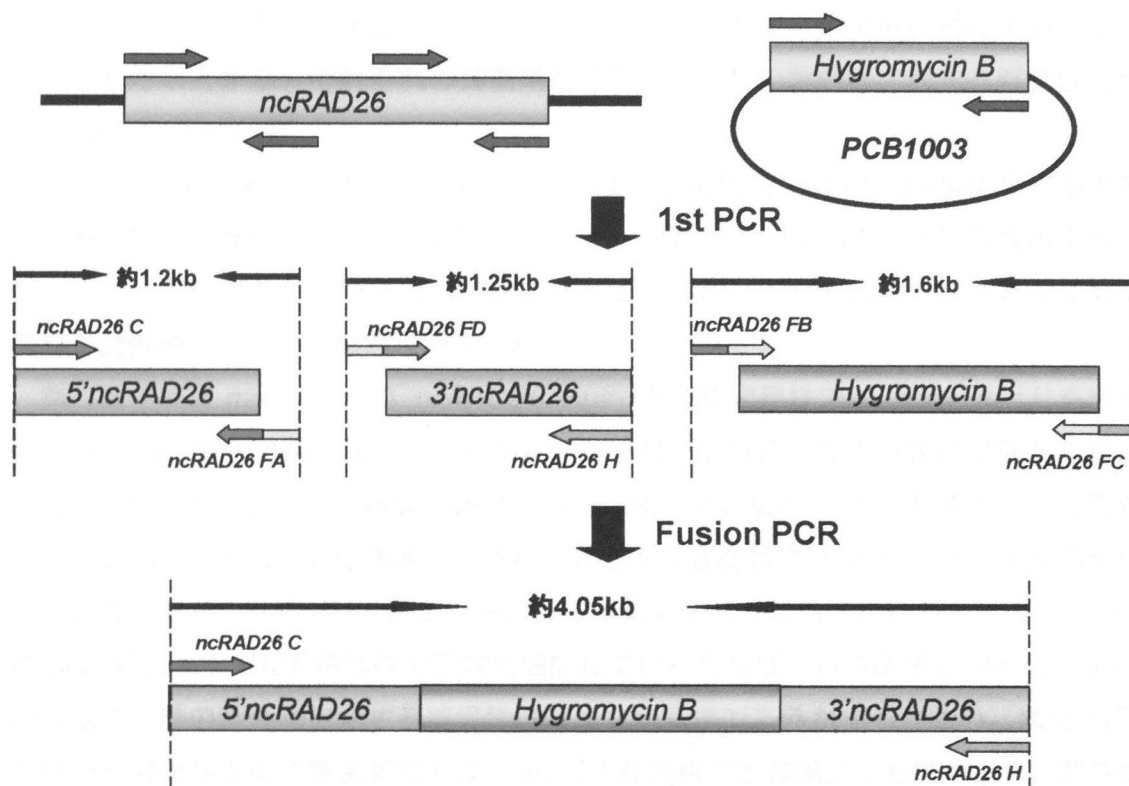


Fig. 5-3. *ncRAD26* 破壊株の作成

5-3-3 *ncRAD26* 破壊株の変異原感受性

得られた *ncRAD26* 破壊株とこれらの株間での二重変異株について、スポットテストにより紫外線、4NQO、MMS に対する感受性を調べた結果、*ncRAD26* 破壊株は UV、4NQO、MMS の変異原に対して顕著な感受性を示さなかったことから、GGR に相補されているために感受性が確認出来ないと予想した。

しかし、*ncRAD26* 破壊株は、アカパンカビ *NER mus-38*、第二除去修復の変異株である *mus-18*、複製後修復系 *Uvs-2*、変異株との二重変異株において、紫外線、4NQO に高い感受性を示した。組換え修復系 *mei-3* 変異株との二重変異株では紫外線と MMS に対し若干の感受性が確認された。

5-3-4 *ncRAD26* におけるエピスタシス解析

変異原によるスポットテストによって、*ncRAD26* もまた修復系に関与することが予想されたことから、それぞれの修復系との二重変異株の紫外線に対する感受性を詳細に調べた (Fig5-4)。

ncRAD26 破壊株の紫外線に対する生存率は UV400J において 0.6%の生存率であり、野生株と顕著な差が確認出来た。また *mus-40, mus-43* 変異株と同程度の生存率であった。そして他の修復系との関連を調べるために、それぞれの修復系との二重変異株の紫外線に対する生存率を測定した。

第二除去修復 *mus-18* との *ncRAD26 mus-18* 二重変異株では *mus-18* よりも紫外線に対する感受性が高くなったことから、*ncRAD26* は第二除去修復には関与しないことが示唆された。そして複製後修復 *uvr-2*、組換え修復系 *mei-3* 変異株との二重変異株において、それらの修復系と *ncRAD26* との二重変異株は *uvr-2, mei-3* の感受性と同程度であり、*ncRAD26* がこれらの修復系にも関与する可能性はあるものの、NER の GGR 系が *ncRAD26* 破壊株で正常に機能しているならば、*ncRAD26* と *uvr-2, mei-3* の二重変異株の紫外線に対する感受性は妥当な生存率であるかもしれない。また NER *mus-38* 変異株との二重変異株では *mus-38* 変異株の生存率よりも低くなり、紫外線に対する感受性が増大した。

以上より、*ncRAD26* 破壊株のエピスタシス解析により、アカパンカビの NER にも GGR と TCR の系が存在することが示唆された。

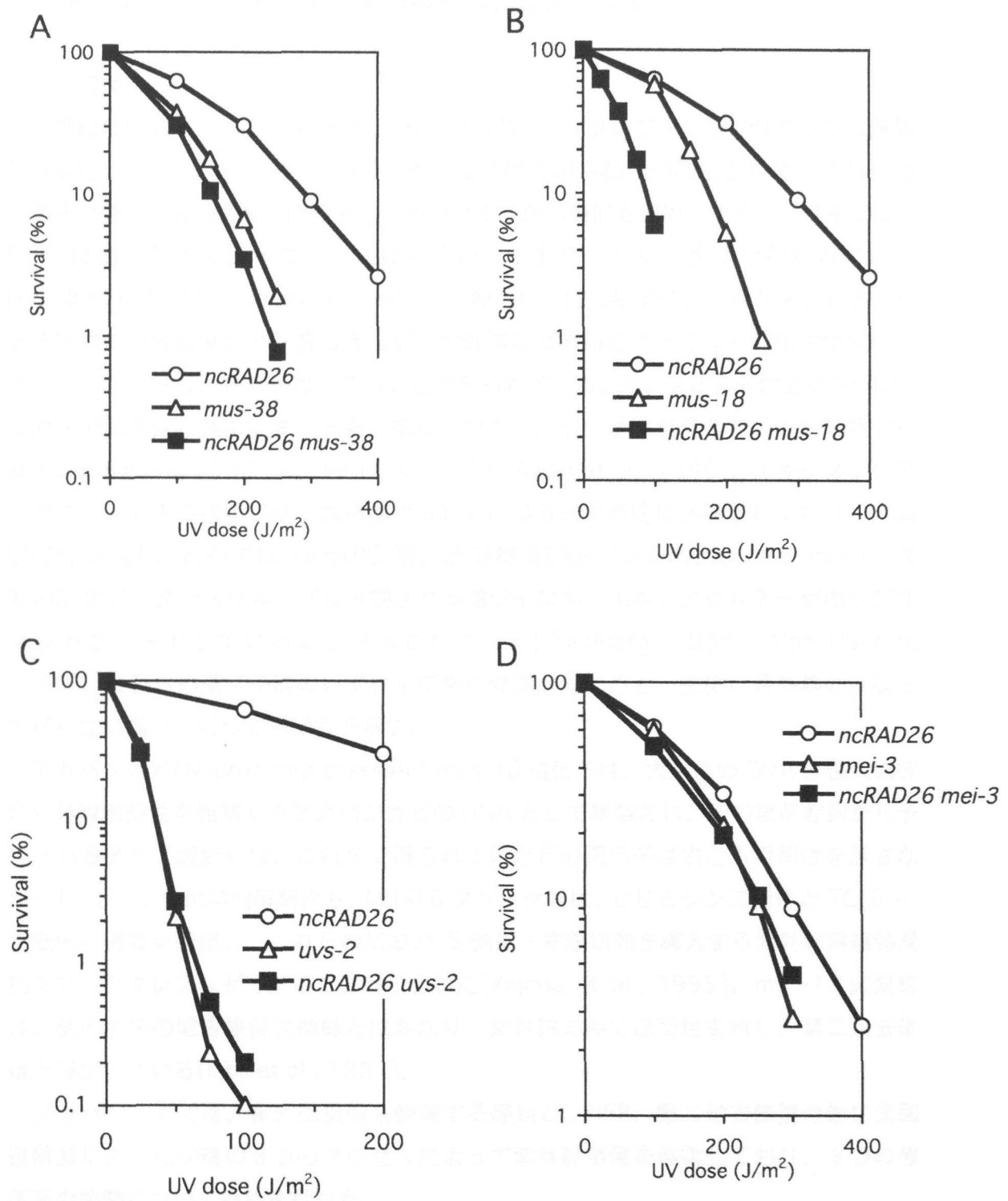


Fig. 5-4. *ncRAD26* 破壊株のエピスタシス解析

(A)NER 系 *mus-38* 変異株、(B)第二除去修復系 *mus-18* 変異株、(C)組換え修復系 *mei-3* 変異株、(D)複製後修復系 *uvs-2* 変異株との二重変異株の紫外線に対する感受性をそれぞれ調べた。

第 6 章 NER 経路と第二除去修復経路、光回復との関係

6-1 緒言

紫外線の照射によって DNA に生じる主な損傷は、シクロブタン型ピリミジン二量体 (CPDs) と (6-4) 光産物 (6-4PPs) である。生物はその進化の過程において、これらの損傷を修復し、遺伝情報を維持するためのいくつかの機能を獲得してきた。現在では、DNA 修復に関する様々な研究が微生物からヒトまで多くの生物で行われている [Friedberg, 1988; Thompson, 1989]。一般に多くの生物では、エキシヌクレアーゼと呼ばれる巨大なタンパク質複合体が、紫外線による損傷だけでなく、化学物質によって、DNA に生じた損傷も除去することが知られている。ヌクレオチド除去修復 (NER) は損傷部位を含むヌクレオチドを一括して除去し、最も研究が進んでいる修復系である [Hoeijmakers, 1990; Guzder et al., 1996; Wang et al., 1996]。エキシヌクレアーゼをコードする遺伝子は、大腸菌からヒトに至るまで高度に保存されており、大腸菌 (*Escherichia coli*) では *UvrABC* 系、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では RAD3 エピスタシスグループに分類される遺伝子群が、エキシヌクレアーゼのサブユニットをコードしていることが示されている [Friedberg, 1988; Van Houten, 1990]。これらの遺伝子群のいずれかに突然変異が起こると、生物は紫外線のみならず様々な変異原に対して感受性を示す。

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) の *mus-18* 遺伝子は、大腸菌の DNA 修復欠損株の紫外線感受性を相補するアカパンカビの DNA として単離され、その塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、これまで得られていたどの遺伝子産物とも相同性を示さなかった。また、生化学的解析から、MUS18 タンパク質は、ピリミジン二量体と TC(6-4) 光産物の両方を認識し、これらの損傷の 5' 側に一本鎖切断を導入する紫外線損傷特異的エンドヌクレアーゼであることが示された [Yajima et al., 1995]。 *mus-18* 変異株は、他の生物の除去修復欠損株とは異なり、紫外線のみ感受性を示し、第二除去修復と呼ばれている [Ishii et al., 1991]。

アカパンカビでは、紫外線損傷を修復する経路が、NER、第二除去修復の他に光回復酵素による光回復の 3 つのプロセスによって紫外線損傷を修復しており、3 つの修復系の相関について解析を行った。

6-2 材料と方法

[使用菌株とベクター]

本実験で使用したアカパンカビの株とその遺伝子型を Table 6-1 に示した。アカパンカビ野生株として、C1-T10-37A と C1-T10-28a をそれぞれ使用した[Tamaru and Inoue, 1989]。 *mus-18* 変異株 (C2-T40-9A) 、は、埼玉大学遺伝学研究室より頂いた。

Table 6-1. Strains of *N.crassa* used in this study

Strain number	Genotype	Source/reference
C1-T10-37A	<i>A</i>	Tamaru and Inoue (1986)
C1-T10-28a	<i>A</i>	Tamaru and Inoue (1986)
C2-T40-9A	<i>A al-2 pan-2 cot-1 mus-18</i>	Ishii et al.(1991)
MST-CT-1A	<i>A mus-43^{RIP}</i>	This study
MST-CT-1a	<i>a mus-43^{RIP}</i>	This study
MST-m18-2a	<i>A mus-18 mus-43^{RIP} pan-2</i>	This study
TNK-CT-1A	<i>A mus-44^{RIP}</i>	This study
TNK-CT-1a	<i>a mus-44^{RIP}</i>	This study
TNK-m18-4A	<i>A mus-18 mus-44^{RIP} pan-2</i>	This study

FGSC, Fungal Genetic Stock Center

[培地]

アカパンカビの培養には、グリセロール完全培地を用いた [Tatum et al., 1950] 。この培地の組成を Table 6-2 に示した。コロニー形成用の培地には、Vogel's の最少培地に 1%のソルボース、0.2%のショ糖、1.2%の寒天を加えて用いた。パントテン酸を要求する株に対しては、培地にパントテン酸カルシウムを 0.01mg/ml になるように加えた[David and de Serres, 1970]。

Table 6-2. Mediums used in this study

50×Vogel's 最少培地(1000ml 中)		
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		125g
KH_2PO_4		250g
KH_4NO_3		100g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		10g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		5g
ビオチン水溶液		25ml
Vogel's 微量元素液		5ml
Vogel's 微量元素液(100ml 中)		
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		5g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		5g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		1g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.25g
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		0.05g
H_3BO_3		0.05g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.05g
ビオチン水溶液 (1000ml 中)		
Biotin		40mg
ビタミンストック溶液 (100ml 中)		
サイアミン (ビタミン B1)		10mg
リボフラビン (ビタミン B2)		5mg
ピリドキシン (ビタミン B6)		5mg
パントテン酸カルシウム		50mg
パラアミノ安息香酸		5mg
ニコチン酸アミド		5mg
塩酸コリン		100mg
葉酸		1mg
イノシトール		100mg

[エンドヌクレアーゼによる紫外線損傷 CPDs 除去能の解析]

エンドヌクレアーゼによる CPDs 除去能の解析は Ishii らの方法[Ishii et al., 1998]で行った。グリセロール完全培地で、7-9 日間培養したアカパンカビの分生子を集め、1/15M リン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、 2.5×10^6 /ml に調整した。その調整液を紫外線未照射のコントロールと紫外線照射 $250\text{J}/\text{m}^2$ のものとで分けた。さらに紫外線を照射した方に関しては、暗条件下で液体保持(0h、18h)を行った。それぞれ 12ml にし、濃度は 2.5×10^8 個になるようにする。紫外線未処理、紫外線処理した分生子からゲノム DNA を抽出し、CPDs を特異的に切断する *M.luteus* 由来の endonuclease で処理した後、アルカリアガロースゲル電気泳動を行い、ゲノム DNA のバンドパターンを確認した。

[アルカリアガロースゲル電気泳動]

50mM NaCl、1mM EDTA 溶液中に、1%の濃度になるように粉末アガロースを加え、アルカリアガロースゲルを作製した。サンプルを泳動する前に、アルカリアガロースゲルをアルカリ泳動 buffer (50mM NaOH、1mM EDTA) で 30 分間平衡化した。サンプルにアルカリ loading buffer[300mM NaOH、6mM EDTA、18% フィコール、0.15%プロモクレゾールグリーン (BCG) 、0.25% キシレンシアノール (XC)]を加え、35V で泳動した。泳動したゲルを染色するために、中和 buffer[1M Tris-HCl(pH7.6)、1.5M NaCl]で 45 分間穏やかに振とうした後、エチジウムブロマイドにて染色し、写真撮影後、泳動パターンを比較した。

[アカパンカビのゲノム DNA の調整]

グリセロール完全培地で 7-9 日間培養したアカパンカビの分生子を集め、 2×10^7 個/ml になるようにリン酸緩衝液(0.067M,pH7.0)に懸濁し、これを実験に用いた。紫外線照射は、National の GL-10 殺菌灯 2 本を線源として行った。線量率を UV 線量計(Topcon 社 ; uvr-254)で測定し、 $2.5\text{J}/\text{sec}/\text{m}^2$ になるように電圧を調整した。あらかじめ冷やしておいた懸濁液 6ml を 6cm シャーレに入れ、スターラーで攪拌しながら、0、25、50、75、100、 $150\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線を照射した。照射直後の分生子から抽出した DNA を、抗体を利用した紫外線損傷の測定におけるスタンダードとした。 $100\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線を照射した懸濁液を、照射後、30℃の暗所または可視光下で静置した。一定の時間ごと (30 分、60 分、120 分、180 分) に懸濁液の一部を回収し、それぞれから DNA を抽出した。DNA の抽出は以下のように行った。懸濁液は、あらかじめ冷やしておいた 15ml 遠心管に入れ、直ちに氷冷した。可視光が当たらないよ

うに遠心管をアルミホイルで包んで、4℃で 2500rpm、10 分間遠心し、分生子を集めた。この分生子を 500 μ l の抽出緩衝液（1%SDS を含む STE [1mM NaCl、10mM Tris-HCl[pH8.0]、1mM EDTA] ）に再懸濁し、あらかじめ 250 μ l 程度のグラスビーズと 0.1M Tris-HCl (pH8.0) で飽和したフェノール溶液 500 μ l を入れた 2ml マイクロチューブに移した。カプセルミキサー（シージー社；CAPSULE-MIXER CM-1）にマイクロチューブをセットし、セメントモードで 1 分間攪拌し分生子を破碎した。光回復を防ぐために、ここまでの操作は赤色灯下で行った。4℃で 15,000rpm、10 分間遠心し、上清をエッペンドルフチューブに取り、フェノール/クロロホルム（Tris-HCl で飽和したフェノールとクロロホルム、イソアミルアルコールを 25:24:1 の割合で混合）抽出を行った。エタノール沈殿によって得られた沈殿を、50 μ l の TE (10mM Tris-HCl [pH8.0]、1mM EDTA) に溶解した。5 μ l の Rnase A (10mg/ml) を 2 μ l 加え、37℃で 1 時間処理した。さらに、proteinase K (10mg/ml) を 2 μ l 加えて、37℃で 1 時間処理した。TE を加えて、全量を 500 μ l に調整し、4℃で、65,000rpm、30 分間遠心した。上清をエッペンドルフチューブに取り、フェノール/クロロホルム抽出を数回繰り返した。水層に 300 μ l の PEG 溶液（20%PEG6000、2.5M NaCl）を加え、4℃に 1 時間静置した。遠心後、得られた沈殿を滅菌水に溶解し、分光光度計(BECKMAN 社；DU640)を使い O.D.260nm で DNA 濃度を測定した。最終的にこの DNA 溶液を 10mM PBS (pH7.4) の 500 μ l 溶液にした。

[Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法による紫外線損傷の測定]

ELISA 法は、Matsunaga らの方法を改変して行った〔Matsunaga et al., 1990〕。チミン二量体および TC(6-4)光産物に対する抗体は、MX-thymine dimer、64M-2（協和メディックス社）を用いた。96 穴マイクロタイタープレート(Falcon 社；平底型ビニールプレート 001-010-2801)に 1%硫酸プロタミン（50 μ l/well）を入れ、37℃で 2 時間静置しウェルをコートした。10mM PBS を用いて、DNA を 1 μ g/ml（チミン二量体測定用）、6 μ g/ml (TC(6-4)光産物測定用)の濃度に調整した。この DNA を熱処理して一本鎖にしたものを各ウェルに 50 μ l ずつ分注し、37℃に一晩静置してウェルに吸着させた。抗体の非特異的結合を阻害するために、2%FBS(fetal bovine serum)を加えて(150 μ l/well)、37℃に 30 分静置した。このプレートを PBS-T (0.05% Tween-20 を含む PBS)で 5 回洗った。1 次抗体をそれぞれ 10mM PBS で 1/1000 に希釈して加え（100 μ l/well）、37℃で 30 分間反応させた。プレートを PBS-T で 5 回洗った後、10mM PBS を用いて、ペルオキシダーゼ標識した 2 次抗体（Cappel 社；peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG）を、MIX-

Thymine dimer に対しては 1/4000、64M-2 に対しては 1/2000 にそれぞれ希釈し、37℃で 40 分間反応させた(100 μ l/well)。その後プレートを PBS-T で 3 回、クエン酸リン酸緩衝液(pH5.0)に溶かし、これに 2.4 μ l の H₂O₂ を加えて準備した基質溶液をウェルに分注し(100 μ l/well)、チミン二量体測定用プレートは 20 分、TC(6-4)光産物測定用プレートは 15 分間、37℃で発色させた。いずれも、2M H₂SO₄(50 μ l/well)を加えて反応を停止した後、直ちにマイクロプレートリーダー(BIO RAD 社 ; Model550)で吸光度(OD₄₉₀)を測定した。紫外線照射後に回収した分生子から抽出した DNA における吸光度で標準曲線を作成し、この標準曲線をもとに実験区の紫外線損傷量を測定した。

[液体保持と遅延光回復]

グリセロール完全培地で 7-9 日間培養したアカパンカビから分生子を集め、10⁶ 個/ml の濃度になるように、リン酸緩衝液(0.067M、pH7.0)に懸濁した。9cm のガラスシャーレに 20ml の懸濁液をとり、スターラーで攪拌しながら紫外線を照射した。線量率は 2.5J/sec/m² に合わせ、照射時間によって総線量を調整した。紫外線を照射した懸濁液を、野生株、*mus-38* 変異株、*mus-40* 変異株、*mus-43* 変異株および *mus-44* 変異株は 10⁴ 個/ml に希釈した。紫外線照射直後の分生子を、TOSHIBA の FL15W 蛍光灯 2 本を光源とした可視光下約 10cm の距離に一定時間ごと(10 分、20 分、30 分、40 分、50 分、60 分)静置して光回復処理し、これを遅延光回復処理とした。それぞれの処理を行った希釈液を、60℃に保っておいたコロニー形成用培地に混ぜ、シャーレに均等に広げた。2 日間 30℃で培養し、生じたコロニーを数えた。紫外線照射前のコロニー数を 100%として、各実験区の生存率を計算した。なお、光回復以外の実験は赤色灯下で行った。

6-3 結果と考察

6-3-1 *mus-43*, *mus-44* 変異株の光回復反応の誘導

アカパンカビは可視光により誘導される DNA 損傷を修復する光回復酵素の存在が知られている[Shimura et al. 1999]。この光回復酵素による光回復反応は *mus-38* 変異株の光回復能に異常があることから、*mus-38* により誘導される可能性が報告されていた[Ishii et al., 1998]。ヒトや出芽酵母の NER モデルより、XPA, Rad14 にホモログである *mus-43* 遺伝子は NER 下流で機能するエンドヌクレアーゼをコードする XPF-ERCC1, Rad1-Rad10 にホモログな *mus-38*, *mus-44* よりも上流に位置することが考えられ、*mus-43*, *mus-44* 変異株が光回復能を調べた(Fig. 6-1)。

野生株では紫外線照射後、液体保持 20 分間で生存率の上昇が見られ、紫外線照射 400J/m² において、液体保持 60 分後には生存率が 50%近くまで回復した(Fig. 6-1A)。*mus-38* 変異株ではこれまでに報告されているように光回復能に異常がみられ、光回復による生存率の上昇はみられるものの、野生株レベルではなかった(Fig. 6-1B)。*mus-38* と同様に NER の下流でエンドヌクレアーゼとして機能することが予想される *mus-40* 変異株では液体保持時間に違いはあるものの、野生株と同程度の光回復がみられた(Fig. 6-1C)。*mus-43* 変異株でも液体保持時間に野生株との違いはあるものの、野生株、*mus-40* 変異株と同様に光回復能が正常であり、紫外線 300J/m² において、可視光照射 60 分後には 60%以上の回復が確認された(Fig. 6-1D)。しかしながら、紫外線 150J/m² における *mus-44* 変異株の光回復は、60 分間の液体保持でも生存率の上昇が 10%未満に留まり、*mus-38* 変異株と同程度の光回復率であった。野生株、*mus-40*, *mus-43* 変異株との光回復反応は液体保持時間に相違はあるものの、正常に光回復がみられたが、*mus-38*, *mus-44* 変異株では光回復に部分的な欠損があることが明らかになった。しかしながら、*mus-38*, *mus-44* 変異株における光回復は完全に欠損しておらず、生存率に若干の増加が見られた。これは光回復酵素ではなく、*mus-18* 遺伝子が関与する第二除去修復が損傷を修復している可能性がある。

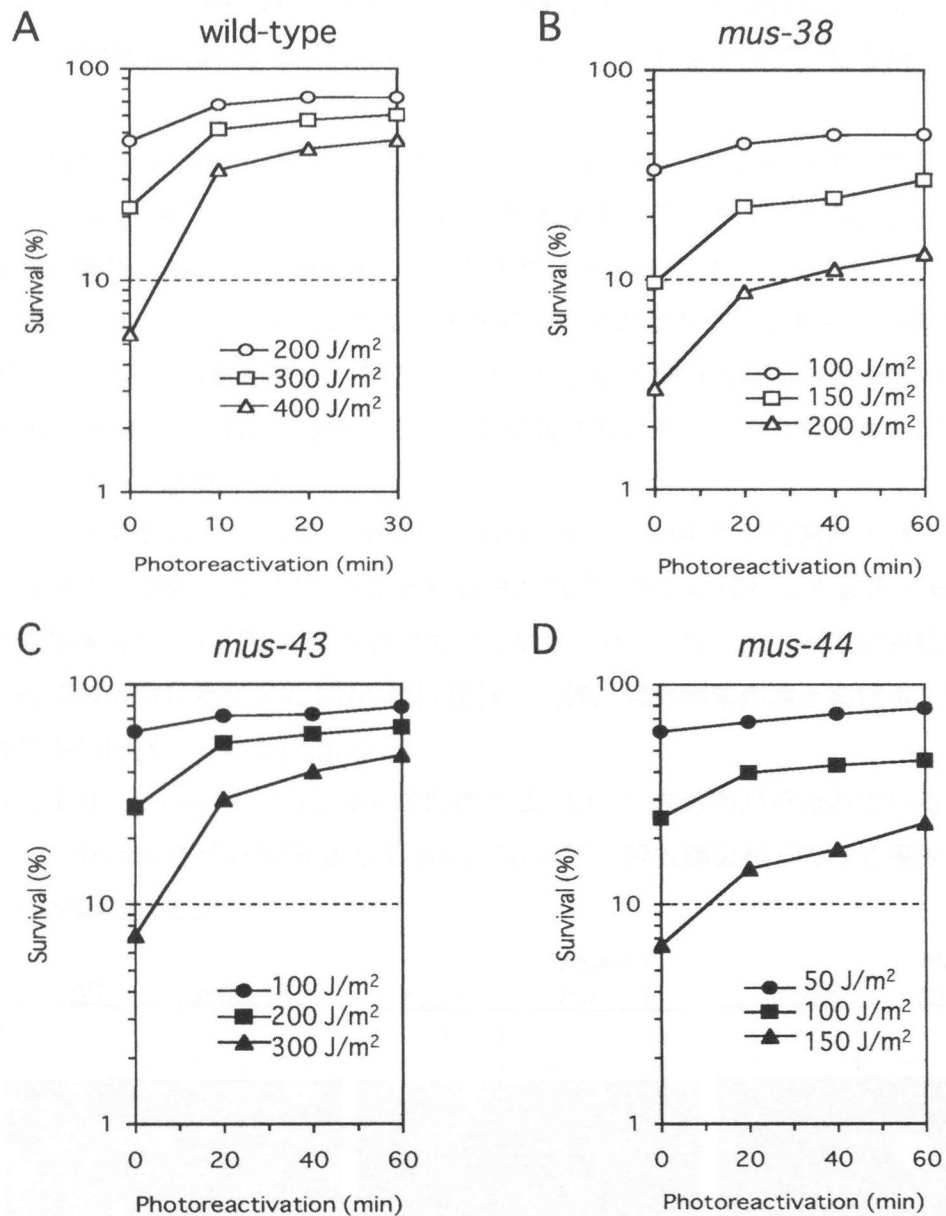


Fig.6-1 紫外線照射後の光回復が生存率に及ぼす効果

(A) 野生株、(B) *mus-38* 変異株、(C) *mus-43* 変異株、(D) *mus-44* 変異株。

紫外線照射量に差はあるものの、*mus-38* 変異株、*mus-44* 変異株は部分的な光回復の欠損がみられた。

6-3-2 *Micrococcus luteus* エンドヌクレアーゼによる CPDs 除去能の解析

mus-43, *mus-44* 変異株が紫外線により誘起される CPDs を修復出来るのかどうか、CPDs を特異的に消化する *Micrococcus luteus* エンドヌクレアーゼを用いて CPDs の除去能を調べた。

紫外線未処理、紫外線処理、紫外線照射後液体保持（暗条件下での修復）の分生子からゲノム DNA を抽出し、*M.luteus* エンドヌクレアーゼで処理し、アルカリアガロースゲル電気泳動による泳動パターンを比較した(Fig. 6-2)。

野生株では、コントロールである紫外線未照射のサンプルに比べ紫外線処理を行ったゲノム DNA の泳動パターンが下方に移行し、紫外線照射後液体保持を施したゲノム DNA は 18 時間の液体保持中に CPDs が修復されたためコントロールと同様の泳動パターンを示した(Fig. 6-2)。

mus-18 変異株、*mus-43 mus18*, *mus18 mus-44* 二重変異株では、紫外線照射後液体保持したゲノム DNA が紫外線処理と同様、下方に移行したままであり、18 時間の液体保持中に CPDs が除去されていないが、*mus-43*, *mus-44* 変異株では紫外線照射後液体保持したゲノム DNA は野生株と同様、紫外線未処理と同程度までゲノムの断片化から回復していた(Fig. 6-2)。

以上より、*mus-43*, *mus-44* 変異株では、CPDs の除去が行われていることが確認され、アカパンカビの NER よりも *mus-18* の第二除去修復が CPDs を優先的に除去することが示された。

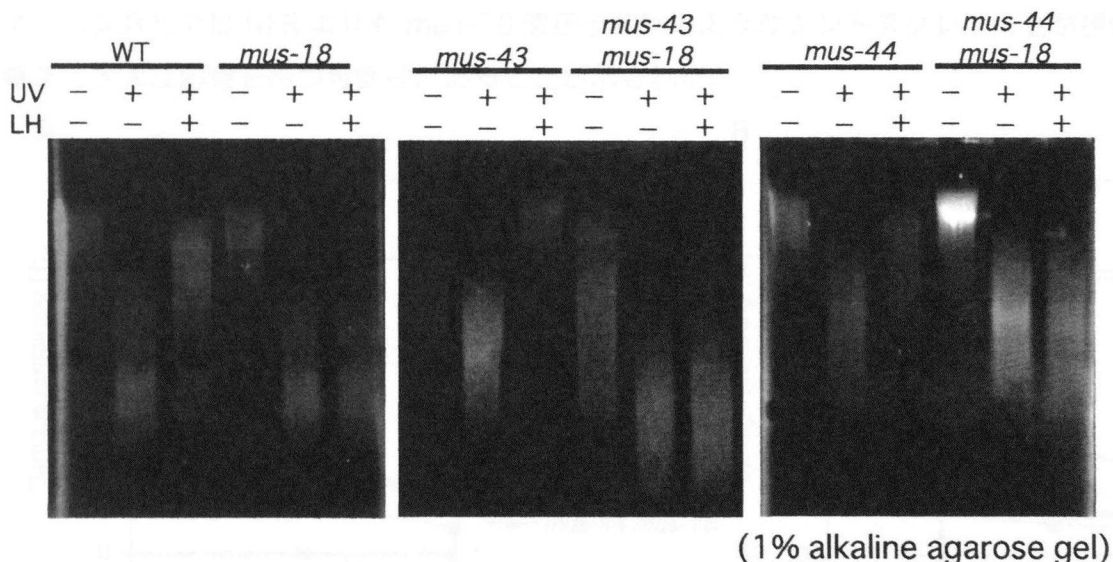


Fig.6-2 *M.luteus* エンドヌクレアーゼを用いた CPDs 除去能の確認

UV: 紫外線照射は 200J/m², LH: 液体保持は紫外線照射後 18 時間行った。

6-3-3 ELISA 法による損傷除去の測定

CPDs と 6-4PPs のそれぞれの抗体を用いた ELISA 法により、*mus-43*, *mus-44* 変異株の損傷除去能を調べた。

CPDs の除去能は先の *Micrococcus luteus* エンドヌクラーゼを用いた実験結果とそれぞれ一致し、*mus-18* 変異株では 180 分後でも 40% 前後の除去にとどまる一方、*mus-43*, *mus-44* 変異株では、CPDs を約 75% 除去していることが示された (Fig. 6-3A)。さらに *mus-43 mus18*, *mus-44 mus-18* 二重変異株では全く CPDs を除去することが出来ないことから、アカパンカビにおいて CPDs の除去には第二除去修復である *mus-18* が主に修復していることが ELISA 法でも示された (Fig. 6-3A)。しかしながら、*mus-18* 変異株の紫外線に対する感受性は、NER 変異株である *mus-38*, *mus-44* 変異株と同レベルであることから、損傷に対して NER と第二除去修復は同程度の重要性があると考えられ、互いの系を相補している可能性がある。

6-4PPs においても、CPDs と同様の結果が示された (Fig. 6-3B)。野生株の損傷除去には修復速度に若干の差があるものの、180 分の液体保持で約 80% の損傷が除去され、*mus-43*, *mus-44* 変異株と大差は見られず、第二除去修復系である *mus-18* 変異株では CPDs と比べ 6-4PPs の除去率が、180 分後で 75% 近くまで上昇した (Fig. 6-3B)。

以上より、暗条件下では *mus-18* の関与する第二除去修復が優先される事が示唆されたが、*mus-43*, *mus-44* 変異株では CPDs、6-4PPs の修復に相違がみられなく、アカパンカビでは NER よりも *mus-18* 遺伝子産物のようなエンドヌクラーゼが損傷修復に多大な影響を持つ可能性があることが示された。

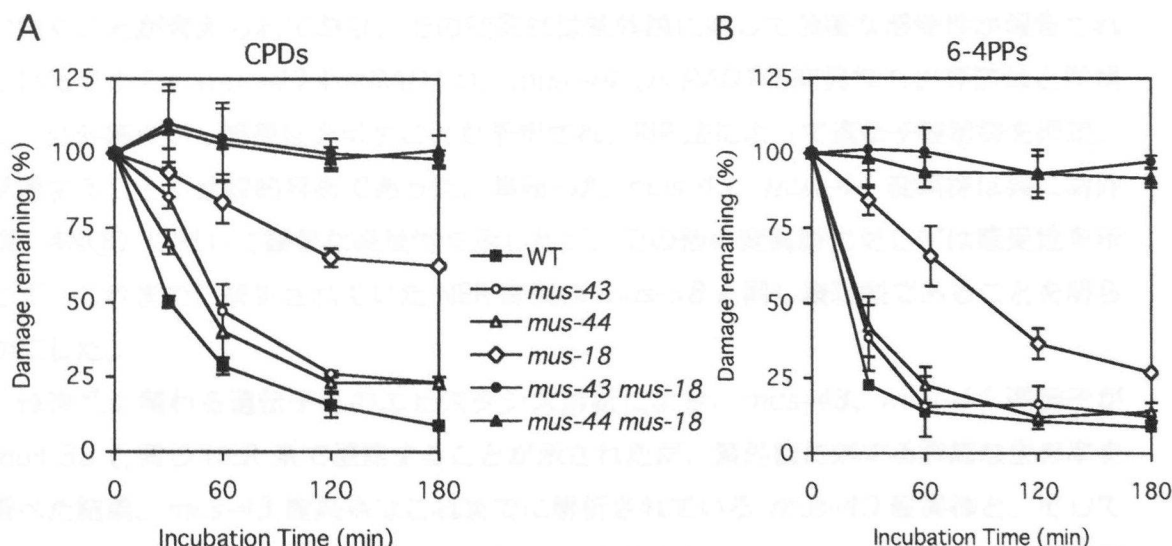


Fig.6-3 ELISA 法による紫外線損傷認識抗体の DNA に対する結合

(A) 紫外線損傷 CPDs に結合する抗体を用いて、ゲノム DNA に残存する損傷量を測定した。

(B) 紫外線損傷 6-4PPs に結合する抗体を用いて、ゲノム DNA に残存する損傷量を測定した。

第7章 総合考察および結論

[アカパンカビのNER経路]

これまでにアカパンカビのNERは *mus-38* と *mus-40* の二つの遺伝子が解析されていたが、その他のNER遺伝子の存在は、アカパンカビにおいては確認されていなかった。近年、アカパンカビゲノムプロジェクトの公開により、ヒト、出芽酵母、分裂酵母に相同なNER遺伝子がアカパンカビにおいてもほとんど存在することが明らかになった。そして今回、新たに6種類の遺伝子 (*ncRAD4A*, *ncRAD4B*, *ncRAD10*, *ncRAD14*, *ncRAD23*, *ncRAD26*) のそれぞれの遺伝子破壊株を作成、解析することで、アカパンカビにおけるNER経路の全体像を明らかにした。

近年までアカパンカビの遺伝子破壊は、外来遺伝子を導入した形質転換体を交雑させることにより、点突然変異を誘発させるRIP法が主流であり、遺伝子破壊株の同定には、変異原に対する感受性を指標として単離・解析が行われてきた。そのため、実際に遺伝子が破壊されていたとしても変異原に感受性を示さなければ同定する事が困難であった。したがって、アカパンカビのNER研究はヒトや出芽酵母と比べほとんど進められていなかった。

アカパンカビ *mus-38* は、ヒトXPF、出芽酵母 *RAD1* に相同な遺伝子であり、*mus-40* は、ヒトXPG、出芽酵母 *RAD2* に相同な遺伝子で、ともにNERの下流域で構造特異的エンドヌクレアーゼとして機能する。

出芽酵母の *RAD10*, *RAD14* 遺伝子も、NERのGGR、TCR損傷認識以降の下流域で働くことが考えられており、その変異株は紫外線に対して顕著な感受性が報告されていたことから、*mus-43* (*ncRAD14*)、*mus-44* (*ncRAD10*)変異株も出芽酵母と同様に、紫外線に対し感受性を示すことが予想され、RIP法によって遺伝子破壊株を同定、単離することが比較的容易であった。単離した *mus-43*, *mus-44* 変異株は共に紫外線、4NQOに対して顕著な感受性を示したが、その他の変異原に対しては感受性を示さず、これまでに解析されていたNER変異株 *mus-38* と同じ表現型であることを明らかにした。

修復系に関わる遺伝子とのエピスタシス解析により、*mus-43*, *mus-44* 遺伝子が *mus-38* と同じNER系で機能することが示されたが、紫外線に対する詳細な生存率を調べた結果、*mus-43* 変異株はこれまでに解析されている *mus-40* 変異株と、そして *mus-44* 変異株は *mus-38* 変異株と同程度の感受性を示し、*mus-40* や *mus-43* 変異株よりも感受性が高く、紫外線に対する生存率に顕著な差異があり、他の生物ではみ

られない現象がみられた。

同じ NER 系遺伝子変異株間で紫外線に対する感受性に相違がある理由として、ヒトの NER では、損傷 DNA の 5' 側構造特異的エンドヌクレアーゼが組換えにも関与する報告があり[Wei yang, 2003]、アカパンカビの 5' 側構造特異的エンドヌクレアーゼをコードする *mus-38* と *mus-44* は NER 以外へ関与する可能性も考えられ、同一の修復系の中でも複数の役割を担う遺伝子があることが予想された。*mus-38* と *mus-44* 変異株は、他の NER 変異株よりも紫外線に対する感受性が高く、5' 末端側構造特異的エンドヌクレアーゼの欠損が、アカパンカビの生体内で正常な代謝活動を阻害する要因となることが考えられた。

変異原は癌化の要因でもあり、突然変異の上昇に起因する。*mus-43* と *mus-44* 変異株では、紫外線による復帰突然変異頻度がともに野生株よりも上昇し、*mus-44* 変異株においては *mus-43* 変異株よりも突然変異を高頻度で誘発することが明らかになった。したがって、アカパンカビの NER において、*mus-43* よりも *mus-44* 変異株の方が突然変異を誘発する事から、*mus-44* の NER における重要性が高い事が示唆された。

mus-44 変異株における NER は、*mus-40* による 3' 末端側の損傷 DNA の切除が正常であり、*mus-44* 遺伝子産物の損傷 DNA の 5' 末端側のエンドヌクレアーゼが損傷 DNA を切除出来ない場合、flap な状態の損傷 DNA 断片が第二除去修復や DNA リガーゼを阻害しミスマッチ修復などが損傷 DNA に介入するために突然変異を誘発すると予想される。従って、*mus-43* 変異株では、損傷 DNA に NER 複合体が集合しないために、第二除去修復がスムーズな修復を正常に完了し得る可能性がある。また *mus-44* 遺伝子は、末端側に繰り返し配列がみられる事から、紫外線損傷などがこの領域に付加しやすいために突然変異頻度が上昇する可能性がある。

NER 上流域の GGR、TCR 損傷認識で機能する出芽酵母 *RAD4* と *RAD23* に相同なアカパンカビ *ncRAD4A*、*ncRAD4B*、*ncRAD23*、そして TCR 経路で機能する出芽酵母 *RAD26* に相同な *ncRAD26* 遺伝子は、すべて相同組換え法によって遺伝子破壊を行った。

アカパンカビ *mus-44* は出芽酵母 *RAD10* よりも分裂酵母 *Swi10* に対して高い相同性が確認されたが、*ncRAD4* においても、分裂酵母 *rhp4A* (*rhp41*)、*rhp4B* (*rhp42*) と同様に二つの遺伝子が発見された[Fukumoto et al., 2002]。したがって、アカパンカビの二つの *RAD4* 遺伝子も分裂酵母 *rhp4A*、*rhp4B* と類似した働きを持つことが予想された。

出芽酵母 Rad4-Rad23 複合体は損傷の有無にかかわらず、DNA に結合することが

これまでにわかっており、複製や組換えなどの代謝を阻害する可能性がある [Fukumoto et al., 2002]。それを避けるために、Rad23 はユビキチンを介して proteasome によって、余分な Rad4-Rad23 タンパク質が分解され、調節されている。この出芽酵母 Rad23 の UBA,UBL ドメインと高い相同性を示す部位がアカパンカビ NCRAD23 にも存在するため、非選択的に結合した NCRAD4-NCRAD23 タンパク質をユビキチンが制御している可能性が高い。

ncRAD4A、*ncRAD4B*、*ncRAD23* 破壊株の紫外線に対する感受性をスポットテストにより確認したが、顕著な感受性は確認されなかった。しかし、二重および三重破壊株を作成し、生存率を測定したことで紫外線に対する詳細な感受性が明らかとなった。出芽酵母 Rad4-Rad23、ヒト XPC-HR23B、分裂酵母 Rhp4A・Rhp4B-rhp23 はともに複合体を形成し、NER の GGR で特異的に働いていると報告されていることから、*ncRAD4A*、*ncRAD4B*、*ncRAD23* の多重変異株の作成し解析を行った。*ncRAD4A ncRAD23* 二重変異株、*ncRAD4A ncRAD4B* 二重変異株は単一破壊株より紫外線に対して高い感受性を示したが、*ncRAD4B ncRAD23* 二重変異株は野生株と同レベルであった。また、*ncRAD4A ncRAD4B ncRAD23* 三重変異株の紫外線感受性は、*ncRAD4A ncRAD23* 二重変異株、*ncRAD4A ncRAD4B* 二重変異株での感受性と同程度であった。したがって、*ncRAD4B*、*ncRAD23* が *ncRAD4A* を補助することで NER に寄与していることが考えられ、すなわち *ncRAD4A* が *ncRAD4B* もしくは *ncRAD23* と複合体を形成しはじめて NER タンパク質として機能していると考えられた。また、*ncRAD4A ncRAD4B ncRAD23* 三重変異株、*ncRAD4A ncRAD23* 二重変異株、*ncRAD4A ncRAD4B* 二重変異株の紫外線に対する感受性は *mus-40*、*mus-43* 変異株と同レベルであることから、これらの遺伝子は GGR 特異的ではなく、GGR 経路と TCR 経路に共通の経路で働く可能性が示唆された。さらに上流に位置する出芽酵母 *RAD7* と *RAD16* に相同なアカパンカビ *ncRAD7* と *ncRAD16* が GGR 特異的な遺伝子として機能している可能性がある。

NER と同様に紫外線による損傷を修復する第二除去修復 *mus-18* 変異株をバックグラウンドにした時の *ncRAD4A*、*ncRAD4B*、*ncRAD23* の紫外線に対する感受性を調べた結果、*ncRAD4A ncRAD4B mus-18* 三重変異株は *mus-38 mus-18*、*mus-40 mus-18* 二重変異株よりも感受性が低いのに対し、*ncRAD4A ncRAD23 mus-18* 三重変異株では、*mus-38 mus-18*、*mus-40 mus-18* 二重変異株の紫外線に対する感受性が同程度になったことから、NCRAD4A は NCRAD23 と複合体を形成することによって、NER 系で働くことが明らかになった。

TCR で機能する出芽酵母 *RAD26*、ヒト CSB に相同なアカパンカビ *ncRAD26* 遺伝

子産物は、アミノ酸 C 末側に helicase C ドメイン、N 末側に SNF2 family ドメインを有する。ヘリカーゼは ATP を加水分解して DNA 二重らせんの巻き戻し反応を行う事によって転写を促進させるが、SNF2 family は転写調節因子であり、NCRAD26 は転写の調節に重要なタンパク質であると予想された。出芽酵母には TCR 特異的な遺伝子として *RAD28*、ヒトでは CSA が存在し、それらに相同な *ncRAD28* と *ncCSA* 遺伝子もアカパンカビで発見された。この *ncRAD28* と *ncCSA* の破壊株を単離したが、紫外線に対して顕著な感受性を示さなかった。分裂酵母では出芽酵母 Rad28 に相同な遺伝子はゲノム情報のデータベース上では発見されているが、重要なドメインが見られなく、その詳細は明らかになっていない。

データベースから予測される *ncRAD26* は基本的に転写を司る遺伝子である可能性が高く、TCR 特異的な遺伝子として働く事が示唆された。*ncRAD26* 破壊株は紫外線に対し感受性を示さず、NER の GGR 経路が紫外線による損傷修復を相補しているためであると考えられた。エピスタシス解析によって、第二除去修復系以外のすべての修復系に関与する可能性が考えられたが、他の修復系変異株との二重変異株が紫外線に対して相乗的な感受性を示さなかったのは、NER GGR 経路と第二除去修復系が損傷を修復することで説明が出来る。第二除去修復 *mus-18* 変異株との二重変異株が紫外線に対し相乗的な感受性を示したのは、紫外線による損傷を修復する経路が NER GGR だけでは不十分であり、アカパンカビでの第二除去修復系の重要性も示唆する結果である。

また、アカパンカビではヒト CSA、出芽酵母 *RAD28* にそれぞれ相同な *ncCSA* と *ncRAD28* をこれまでに単離したが、紫外線に対する感受性は確認出来ず、もしかすると、*ncRAD4B* のように補助的な役割を担う可能性がある。しかしながら、出芽酵母 *RAD28* に相同な分裂酵母のホモログ遺伝子はその働きが明らかになっていないうえ、顕著なドメインが確認されていない事から修復系に関与する遺伝子ではない可能性がある。現在、GGR 特異的であると予想される *ncRAD7* と *ncRAD26* 二重変異株を解析中であり、その結果を元に解析を進める必要がある。

[*mus-38*, *mus-44* 変異株の光回復の部分的欠損について]

本研究ではNER変異株、*mus-40*, *mus-43*変異株の光回復能は正常であったのに対し、*mus-38*, *mus-44*変異株の光回復能に部分的な欠損があることを明らかにした。*mus-38*, *mus-44*遺伝子は、NERにおいて、損傷DNAの5'側構造特異的エンドヌクレアーゼとして機能することが予想される遺伝子である。したがって、損傷DNA5'側エンドヌクレアーゼが欠損した場合、次のモデルが考えられる(Fig. 7)。

ヒトや出芽酵母のNERでは損傷DNAの3'側が切断された後、損傷DNAの5'側が切断

され、損傷DNAの3'側が切断されなければ5'側の切断が行われなかったことが報告されている。

野生株で光回復による生存率が上昇するのは、DNAに生じたCPDs損傷が光回復によって修復されているためであり、損傷DNA3'側エンドヌクレアーゼが欠損した*mus-40*変異株でも光回復は正常に行われていた。したがって、損傷DNAの3'側に切断が入らない場合は、NER複合体がphotolyaseに置き換われる可能性が考えられる。

一方、5'側のヌクレアーゼが欠損した場合には、損傷DNAの3'側が切断されるが、損傷DNAの5'側は切断されないことから、NER複合体が結合したままとなり、光回復酵素と競合してしまうため、光回復の部分的欠損が起こる可能性が考えられるが、更なる検証が必要である。

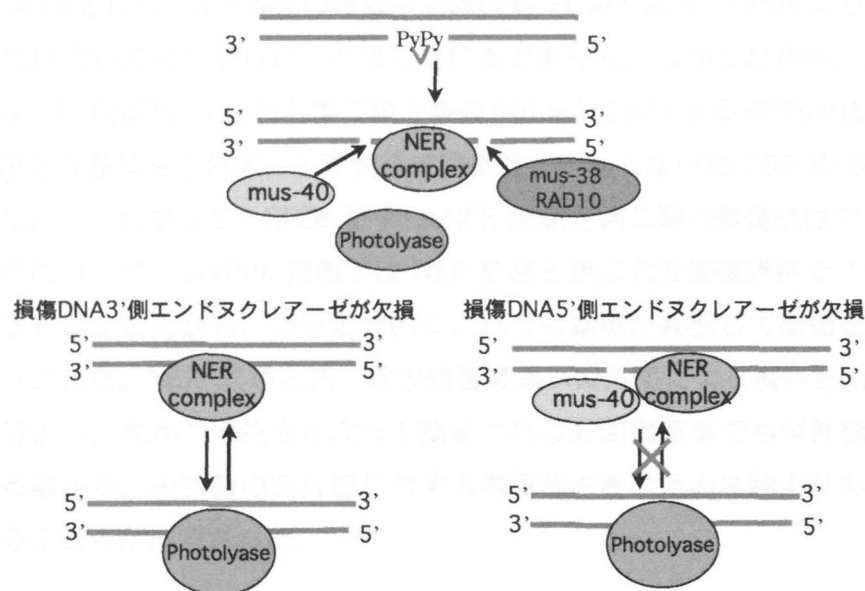


Fig. 7 NER と光回復が競合するモデル

[アカパンカビの紫外線損傷除去能]

紫外線により誘起される CPDs を特異的に消化する *Micrococcus luteus* エンドヌクレアーゼを用いて、単離した変異株の CPDs 除去能を調べた結果、*mus-43*、*mus-44* 変異株は CPDs 損傷を十分に除去できること確認した。これは第二除去修復経路が CPDs 損傷を除去している結果であり、NER 経路が CPDs を除去する頻度は第二除去修復経路よりも低いことが伺えた。この結果は CPDs 抗体を用いた ELISA 法によっても明らかになった。

mus-18 は分裂酵母 UVDE とホモログであり、紫外線に依存したエンドヌクレアーゼによってDNAの紫外線損傷であるCPDsを消化する酵素であり、アカパンカビのNER

引用文献

Batty, D.P. and Wood, R.D. 2000. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241: 193-204

Brouwer, J. 1994. The rad7 and rad 16 genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from the silent mating type loci, are also required for repair of the nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6135-6142.

Davis, R.H. and de Serres, F.J. 1970. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol* 17: 79-143.

Doolittle, F.W. 1987. The evolution of DNA sequences : edited by B. C. Clarke, A. Robertson and A. J. Jeffreys The Royal Society, London, 1986. (vii + 354 pages) *Trends in Genetics* 3: 82-83

de Serres, F.J. 1980. Mutagenesis at the ad-3A and ad-3B loci in haploid UV-sensitive strains of *Neurospora crassa*. II. Comparison of dose-response curves for inactivation and mutation induced by UV. *Mutat Res* 71: 181-191.

Friedberg, E.C., Gellert, A.A., Philip, M.C., Hanawalt, J.B., Hays, A.R., Lindahl, L.T. Lowndes, N., Sarasin, A. and Wood, R.D. 2006. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* 5:986-996.

Friedberg, E.C., Evans, M.K., Tafée, B.G., Bohr, V.A., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H.J., Forrester, K. and Harris, C.C., 1995. P53 modulation of TFIIH associated nucleotide excision repair activity. *Nat. Genet.* 10: 188-195.

Friedberg, E.C. 1995. The yeast *RAD2*, but not *RAD1*, gene is involved in the transcription-coupled repair of thymine glycols. *Mutat. Res.* 337: 169-178.

Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. 1995. DNA repair: From molecular

mechanism to human disease DNA Repair and Mutagenesis. DNA Repair 5: 986-996

Friedberg, E.C. 1988. Deoxyribonucleic acid repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev 52 : 70-102.

Friedberg, E.C. 1996. Cockayne syndrome a primary defect in DNA repair, transcription, both or neither? Bio essays 18: 731-738.

Fukumoto, Y., Hiyama, H., Yokoi, M., Nakaseko, Y., Yanagida, M. and Hanaoka, F. 2002. Two budding yeast *RAD4* homologs in fission yeast play different roles in the repair of UV-induced DNA damage. DNA Repair 1: 833-845.

Galliegue-Zouilina, S., Ballieul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H., 1985. Adducts from in vivo action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats and from in vitro reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. Cancer Res. 45: 520-525.

Hess, N.J., Buchko, G.W., Conradson S.D., Espinosa, F.J., Ni, S., Thrall B.D., Kennedy, M.A., 1998. Human nucleotide excision repair protein XPA: extended X-ray absorption fine-structure evidence for a metal-binding domain. Protein Sci: 1970-1975.

Hoeijmakers, J.H. 1993. Nucleotide excision repair I: from *E. coli* to yeast. Trends Genet 9: 173-177.

Hoeijmakers, J.H. 1993. Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. Trends Genet 9: 211-217.

Inoue, H., Ong, T.M. and de Serres, F.J. 1981. Mutagenesis at the ad-3A and ad-3B loci in haploid UV-sensitive strains of *Neurospora crassa*. IV. Comparison of dose-response curves for MNNG, 4NQO and ICR-170 induced inactivation and mutation-induction. Mutat Res 80: 27-41.

- Inoue, H. and Ishii, C. 1984. Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Neurospora crassa*. *Mutat Res* 125: 185-194.
- Ishii, C., Nakamura, K. and Inoue, H. 1998. A new UV-sensitive mutant that suggests a second excision repair pathway in *Neurospora crassa* DNA Repair 408: 171-182
- Irean, J., Miao, V. and Selker, E.U. 1993. Small scale DNA preps for *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Newslett* 40: 24.
- Kow, Y.W., Wallace, S.S., and Van Houten, B. 1990. UvrABC nuclease complex repairs thymine glycol, an oxidative DNA base damage. *Mutat Res* 235: 147-156
- Henning, K.A., Li, L., Iyer, N., Lisa, D., Michael, M.S., Reagan, R.L., Schultz, R.A., Stefanini, M., Lehmann, A.R., Lynne, V.M. and Friedberg, E.C. 1995. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* 82: 555-564.
- Igoucheva, O., Alexeev, V., Scharer, O. and Yoon, K. 2006. Involvement of ERCC1/XPF and XPG in oligodeoxynucleotide-directed gene modification. *Oligonucleotides* 16: 94-104.
- Kuraoka, I., Morita, H., Saijo, M., Matsuda, T., Morikawa, K., Shirakawa, M. and Tanaka, K. 1996. Identification of a damaged-DNA binding domain of the XPA protein. *Mutat Res* 362: 87-95
- Kunz, C. and Fleck, O. 2001. Role of the DNA repair nucleases Rad13, Rad2 and Uve1 of *Schizosaccharomyces pombe* in mismatch correction. *J Mol Biol* 313: 241-253.
- McCready, S.J., Osman, F. and Yasui, A. 2000. Repair of UV damage in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutat Res* 451: 197-210

McDaniel, L.D., Schultz, R.A. and Friedberg, E.C. 2006. TERF2-XPF: Caught in the middle; beginnings from the end. *DNA Repair* 5: 868-872

Plooy, A.C. and van Dijk M. and Lohman, P.H. 1984. Induction and repair of DNA cross-links in chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity, and antitumor activity. *Cancer Res* 44: 2043-2051.

Schärer, O.D. 2007. Achieving Broad Substrate Specificity in Damage Recognition by Binding Accessible Nondamaged DNA. *Molecular Cell* 28: 184-186

Perbal, B.V. 1988. A practical guide to molecular cloning, 2nd ed. John Willy & Sons Inc., New York.

Prakash, S. and Prakash, L. 2000. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res* 451: 13-24

Reynolds, R.J., Love, J.D. and Friedberg, E.C. 1981. Molecular mechanisms of pyrimidine dimer excision in *Saccharomyces cerevisiae*: excision of dimers in cell extracts. *J Bacteriol* 147: 705-8.

Reynolds, R.J. and Friedberg, E.C. 1981. Molecular mechanisms of pyrimidine dimer excision in *Saccharomyces cerevisiae*: incision of ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid in vivo. *J Bacteriol* 146: 692-704.

Selker, E.U. 1990. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annu Rev Genet* 24: 579-613.

Shimura M, Ito Y, Ishii C, Yajima H, Linden H, Harashima T, Yasui A, Inoue H. 1999. Characterization of a *Neurospora crassa* photolyase-deficient mutant generated by repeat induced point mutation of the *phr* gene. *Fungal Genet Biol* 28: 12-20.

van der Vliet, A., Zeeman, A.M., de Groot, N., Cheng, C., Pong, B.D., van der Vliet, A. and Shimura, m., Ito, Y., Ishii, C., Yajima, H., Linden, H., Harashima, T., Yasui, A., and

Inoue, H. 1999. Characterization of a *Neurospora crassa* Photolyase-Deficient Mutant Generated by Repeat Induced Point Mutation of the *phr* Gene. *Fungal Genetics and Biology* 28: 12-20

Tripsianes, K., Folkers, G., Eiso, A.B., Das, D., Odijk, H., Nicolaas G.J., Jan, J., Hoeijmakers, H.J., Kaptein, R. and Boelens, R. 2005. The Structure of the Human ERCC1/XPF Interaction Domains Reveals a Complementary Role for the Two Proteins in Nucleotide Excision Repair. *Structure* 13: 1849-1858

Terleth, C., Schenk, P., Poot, R., Brouwer, J. and Van de P.P. 1990. Differential repair of UV damage in rad mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: a possible function of G2 arrest upon UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4678-4684.

Thomas, M.M., Kunz, C. and Fleck, O. 2003. Repair of damaged and mismatched DNA by the XPC homologues Rhp41 and Rhp42 of fission yeast. *Genetics* 164: 457-467.

Uchida, A., Sugasawa, K., Masutani, C., Dohmae, N., Araki, M., Yokoi, M., Ohkuma, Y. and Hanaoka, F. 2002. The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH. *DNA Repair* 1: 449-461.

Urdea, M.S., Warner, B.D., Running, J.A., Stempien, M., Clyne, J. and Horn, T. 1988. A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 16: 4937-4955.

van Hoffen, A., Natarajan, A.T., Mayne, L.V., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H., Venema, J. 1993. Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucleic Acids Res.* 21: 5890-5895.

Verhage, R., Zeeman, A.M., de Groot, N., Gleig, F., Bang, D.D., van de Putte, P. and Vollmer, S.J. and Yanofsky, C. 1986. Efficient cloning of *Neurospora crassa*. *Proc*

Natl Acad Sci USA 83: 4869-4873.

Yang, W. 2003. Pruning DNA: Structure-Specific Endonucleases (XPF/Rad1/Mus81). *Structure* 11: 365-366

Wang, X.W., Yeh, H., Chaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J.M., Wang, G., Friedberg, E.C., Evans, M.K., Tafée, B.G., Bohr, V.A., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H.J., Forrester, K. and Harris, C.C., 1995. P53 modulation of TFIIH associated nucleotide excision repair activity. *Nat. Genet.* 10: 188-195.

Wood, R.D., 1997. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272, pp. 23465-23468

Yajima, H., Takao, M., Yasuhira, S., Zhao, J.H., Ishii, C., Inoue, H. and Yasui, A. 1995. A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light. *EMBO J* 14: 2393-2399.

Yasuhira, S., Morimyo, M., Yasui, A. 1999. Transcription dependence and the roles of two excision repair pathways for UV damage in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 274: 26822-26827.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導を頂き、また数々の至らない点を常に温かく見守って下さいました藤村真教授に心から感謝し、お礼申し上げます。

公私ともに最も支えて頂いた一石昭彦准教授にお礼申し上げます。

十年間、学生生活を温かく、かつ厳しく見守ってくださった東洋大学の先生方、東洋大学職員の方々にも感謝致します。

常に様々な助言、協力を頂き、また、アカパンカビの菌株を提供していただきました埼玉大学遺伝学研究室の井上弘一教授をはじめ、石井先生、田中先生、畠山先生、遺伝学研究室の皆様心からお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、日頃から様々な協力をしていただきました分子遺伝学研究室の皆様心から感謝いたします。

本研究を行うにあたり、平成 17 年度、井上記念研究助成金の補助を得て研究を行うことが出来ました。深く感謝いたします。

最後に、常日頃から私を支え、協力してくれた両親と家族、友達に心から感謝します。

以上、お名前を挙げた方々、及びお名前を挙げられなかった数多くの方々のお力添えなしには本研究を行うことは出来ませんでした。重ねて御礼申し上げます。

平成 19 年 11 月

